

Untersuchungen zur Wechselwirkung von Heparinkofaktor II aus Plasma und rekombinanten Zellen mit Glykosaminoglykanen

Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von
Dipl. Biol. Christoph Böhme
geboren am 6. Mai 1965
in Bielefeld

2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Ragg
AG Zelluläre Genetik
Technische Fakultät, Universität Bielefeld

2. Gutachter: Prof. Dr. Erwin Flaschel
Lehrstuhl für Fermentationstechnik
Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Tag der Disputation: 27 September 2001

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken,
die mir durch ihre Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.
Meiner Frau Franziska und meiner Tochter Leila danke ich für die Geduld und das
Verständnis während der Anfertigung dieser Arbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. H. Ragg in der Arbeitsgruppe *Zelluläre Genetik* der Technischen Fakultät, Universität Bielefeld durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Ragg danke ich für die Möglichkeit die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, seine vielfältige Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. E. Flaschel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Möglichkeit in der *AG Fermentationstechnik* eine Fermentation durchführen zu können.

Herrn Dipl.-Ing. T. Schäffer danke ich für die tatkräftig Unterstützung bei der *E.-coli*-Fermentation.

Herrn Dr. H. S. Conradt und seiner Arbeitsgruppe in der *Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH* (GBF) in Braunschweig danke ich für die Analysen der posttranslationalen Modifikationen.

Bei Herrn Dipl.-Biol. S. Brinkmeyer möchte ich mich für die Umklonierung der cDNA von HCIIΔ51-76 und die Herstellung des HCIIΔ51-76 exprimierenden *E.-coli*-BI21(DE3)-Stammes bedanken.

Herrn Dipl.-Biol. C. Priesner danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der 2D-Elektrophorese in der Arbeitsgruppe *Zellkulturtechnik* der *Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH* (GBF) in Braunschweig.

Mein Dank gilt Frau A. Strathmann, Frau A. Stenner, Herrn N. Gianakis und Herrn O. Krüger, die im Rahmen ihrer Tätigkeiten als technische Assistentin bzw. Laborpraktikanten zum Gelingen der HCII-Expression in CHO-Zellen beigetragen haben.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen *Zelluläre Genetik* und *Zellkulturtechnik* möchte ich mich für die inspirierende, kooperative und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken .

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen Dagmar, Andrea, Frank und Mathias möchte ich mich für die engagierte Unterstützung bei allerlei sonstigen Tätigkeiten bedanken, die zwar zur Abnutzung von Motorradreifen, Gitarrensaiten, Sommelier-Bestecken und Lachmuskeln führten, aber mein (Doktoranden)-Leben bereicherten.

Ergebnisse dieser Arbeit werden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Böhme C, Nimtze M, Grabenhorst E, Conradt HS, Strathmann A, Ragg H (2002)

Tyrosine sulfation and N-glycosylation of human heparin cofactor II from plasma and recombinant chinese hamster ovary cells and their effects on heparin binding.

European Journal of Biochemistry **296**, 977-988

Inhalt

I Einleitung	1
1 Allgemein	1
7	
2 Serpine	1
2.1 Medizinische Bedeutung	1
2.2 Grundstruktur der Serpine	2
2.3 Konformationszustände der Serpine	3
2.4 Mechanismus der Protease-Inhibition	5
2.5 Heparin-bindende Serpine	6
3 Heparinkofaktor II	6
3.1 Geschichte von Heparinkofaktor II	6
3.2 Genstruktur von Heparinkofaktor II	7
3.3 Protein-Struktur von Heparinkofaktor II	7
3.4 Aktivierung von Heparinkofaktor II durch Heparin bzw. Dermatansulfat	9
3.4.1 Mechanismus der Thrombin-Hemmung durch Antithrombin	11
3.5 Physiologie von Heparinkofaktor II	11
3.5.1 Clearing	14
3.6 Rekombinante Expression	14
4 Glykosaminoglykane, Proteoglykane und extrazelluläre Matrix	15
4.1 Extrazelluläre Matrix	15
4.2 Struktur der Glykosaminoglykane	15
4.3 Proteoglykane	17
4.3.1 Ortsabhängigkeit der HCII-Aktivierung durch Proteoglykane	18
4.4 Wechselwirkung zwischen Glykosaminoglykanen und Proteinen	20
4.4.1 Einfluß der NaCl-Konzentration auf die Protein-Heparin-Interaktion	20
5 Posttranslationale Modifikationen von Proteinen	22
5.1 Glykosylierung von Proteinen	22
5.1.1 Bedeutung der Glykosylierung am Beispiel Antithrombin	24
5.2 Tyrosin-Sulfatierung von Proteinen	24
6 Zielsetzung der Arbeit	26

II Material und Methoden	27
1 Zellkultivierung	27
1.1 Medien	27
1.2 Zelllinien	29
1.2.1 Herstellung der rekombinanten Zelllinie CHO _{HCII}	29
1.2.2 HepG2-Zellen	31
1.2.3 IMR-90-Zellen	31
1.2.4 A549-Zellen	31
1.2.5 Rinderaorta-Endothelzellen (BAEC)	32
1.3 Stammhaltung	32
1.4 Kryokonservierung	32
1.5 Passagieren der Zellen	33
1.6 Mycoplasmen-Test (DAPI-Färbung)	33
1.7 Trypanblau-Ausschlußfärbung	34
1.8 Superspinner-Kultivierung	34
1.9 Spezielle Kulturbedingungen	36
1.9.1 Hemmung der N-Glykosylierung	36
1.9.2 Hemmung der Sulfatierung	37
1.10 Zellspezifische Parameter	38
2 Expression der Deletionsmutanten HCII Δ 51-76 in Escherichia coli	39
2.1 pET-System	39
2.1.1 Herstellung von <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pCBO1	40
2.2 Schüttelkolbenkultivierung	41
2.3 Expression im 5-l-Maßstab	42
3 HCII-Reinigung	44
3.1 Reinigung von Plasma-HCII	44
3.1.1 PEG- und BaCl ₂ -Fällung	45
3.1.2 Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie	45
3.1.3 Ionenaustauscher-Chromatographie	46
3.1.4 Gelfiltration	47
3.1.5 FPLC-System	48
3.2 Reinigung von HCII aus CHO _{HCII} - und HepG2-Überständen	51
3.3 Reinigung von HCII Δ 51-76 aus <i>E. coli</i>	52
3.4 Konzentrierung von HCII	53
4 <i>In-situ</i> -Fluoreszenz-Nachweis von HCII	55
4.1 Fluoreszenz-Methoden	55
4.1.1 Kovalente Kopplung von Fluoreszeinisothiozyanat an HCII	56
4.2 DAPI-Färbung	57

4.3 Mowiol-Einbettung	57
4.4 Fluoreszenzmikroskopie	57
4.5 HCII-Nachweis auf Heparin-Sepharose-Partikel (DASS-Methode)	57
4.6 HCII-Nachweis auf extrazellulärer Matrix	59
4.6.1 Zellkultur in chamber-slides	59
4.6.2 Präparation von extrazellulärer Matrix	59
4.6.3 Immunfluoreszenz-Nachweis von HCII Δ 51-76	60
4.6.4 <i>In situ</i> -Nachweis von FITC-HCII auf extrazellulärer Matrix	61
5 Analytik	62
5.1 Medium-Analytik	62
5.1.1 Aminosäuren-Analytik	62
5.1.2 Enzymatische Bestimmung von Glukose und Laktat	62
5.2 Quantifizierung von HCII	63
5.2.1 ELISA	63
5.2.2 BCA	65
5.2.3 Absorptionsmessung bei 280 nm	65
5.3 Biologische Aktivität	66
5.3.1 Kinetik der Thrombinhemmung durch HCII	66
5.3.2 Komplexierung von HCII und Antithrombin mit Thrombin	68
5.4 SDS-PAGE	69
5.4.1 Coomassie-Blau-Färbung	70
5.4.2 Gel-Auswertung	70
5.5 Western-Blot	71
5.5.1 Elektrotransfer	71
5.5.2 Immundetektion von geblotteten Proteinen	72
5.6 2D-Gelelektrophorese	73
5.7 Heparin- und Dermatansulfat-Affinitätschromatographie	75
5.8 Abspaltung von N-Glykanen mit PNGase F	76
6 Modellierung von HCII	77
6.1 Swiss-Model	77
6.2 Swiss-PDB-Viewer	78

III Ergebnisse	79
1 HCII-Produktion	79
1.1 Humanes Plasma-HCII	79
1.1.1 Reinigung aus humanem Plasma	79
1.1.2 Biologische Aktivität des gereinigten Plasma-HCII	82
1.1.3 Kinetik der Thrombinhemmung durch Plasma-HCII	83
1.2 Herstellung von rekombinantem HCII in CHO-Zellen	85
1.2.1 CHO _{HCII} -Herstellung	85
1.2.2 Superspinner-Kultivierung	87
1.2.3 Reinigung von CHO-HCII	90
1.2.4 Eigenschaften des gereinigten HCII aus CHO-Zellen	91
1.3 HCII aus HepG2-Zellen	93
1.4 Expression der Deletionsmutante HCII Δ 51-76 in <i>E. coli</i>	94
1.4.1 Schüttelkolbenkultivierung	94
1.4.2 Expression von HCII Δ 51-76 im 5-l-Maßstab	95
1.4.3 Reinigung von HCII Δ 51-76 aus der 5-l-Fermentation	96
1.4.4 Molekularmasse und isoelektrischer Punkt von HCII Δ 51-76	98
2 Analyse der posttranslationalen Modifikationen von HCII	99
2.1 Struktur der N-Glykane	99
2.2 Analyse der Tyrosin-Sulfatierungen	101
3 HCII-Bindung an extrazelluläre Matrix	102
3.1 Heparin-Sepharose als Modell für die extrazelluläre Matrix	102
3.1.1 Immunfluoreszenz-Nachweis von Plasma-HCII	102
3.1.2 Fluoreszenz-Nachweis von FITC-HCII	103
3.2 Präparation von extrazellulärer Matrix	105
3.3 Bindung von Plasma-HCII an extrazelluläre Matrix	107
3.4 Bindung von HCII Δ 51-76 an extrazelluläre Matrix	108
4 Glykosaminoglykan-Bindung von HCII, AT und deren Thrombin-Komplexe	110
4.1 Affinität von HCII, AT sowie deren Thrombin-Komplexe zu Heparin	110
4.2 Affinität von HCII, AT sowie deren Thrombin-Komplexe zu Dermatansulfat	113
5 Heparin-Affinität von HCII-Varianten	117
5.1 Wildtyp-HCII aus <i>E. coli</i>	117
5.2 HCII Δ 51-76 aus <i>E. coli</i>	118
5.3 HCII aus Tunicamycin-behandelten CHO- und HepG2-Zellen	119
5.3.1 Hemmung der N-Glykosylierung mit Tunicamycin	119
5.3.2 Heparin-Affinität von HCII aus Tunicamycin-behandelten Zellen	120

5.4 HCII aus Chlorat-behandelten CHO-Zellen	122
5.4.1 2D-Gelelektrophorese von HCII aus Chlorat-behandelten Zellen	124
IV Diskussion	128
1 Herstellung und Reinigung von HCII	128
1.1 HCII-Reinigung aus humanem Plasma	128
1.2 Herstellung von rekombinantem HCII in CHO-Zellen	129
1.3 Herstellung von HCII in HepG2-Zellen	129
1.4 Rekombinantes HCII Δ 51-76 aus <i>E. coli</i>	129
2 Posttranslationale Modifikationen von HCII aus Plasma und CHO-Zellen	130
2.1 Struktur der N-Glykane	131
2.2 Analyse der Tyrosin-Sulfatierungen	131
3 <i>In situ</i> -Nachweis von HCII	132
4 Affinität von HCII bzw. AT und deren Thrombin-Komplexe zu Heparin	134
5 Heparin-Bindung von HCII-Varianten	140
5.1 Einfluß der N-Glykane auf die Heparin-Affinität	140
5.2 Einfluß der Tyrosin-Sulfatierungen auf die Heparin-Affinität.	143
5.3 Modell der Heparin-Bindungsstelle von HCII	143
V Zusammenfassung	145
VI Abkürzungen	147
VII Chemikalienliste	150
VIII Literaturverzeichnis	152

I Einleitung

1 Allgemein

Heparinkofaktor II (HCII) ist ein Inhibitor von Thrombin, dem zentralen Protein der Blutgerinnung. Die Thrombin-Inhibition durch HCII wird von den Glykosaminoglykanen (GAGs) Heparin, Heparansulfat und Dermatan-sulfat katalysiert. An Proteoglykane gebunden, stellen Heparansulfat und Dermatan-sulfat Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) dar, die den interzellulären Raum im Gewebe ausfüllt. HCII gehört zur Proteinfamilie der Serpine. Da die Serpine eine gemeinsame Tertiärstruktur besitzen, die eine außerordentliche allosterische Funktionalität ermöglicht, sollen zunächst die Serpine allgemein vorgestellt werden.

2 Serpine

Serpin ist ein Akronym für Serinprotease-Inhibitor. Die meisten Serpine üben eine Funktion als spezifische Inhibitoren von Serinproteasen aus (Potempa *et al.* 1994). Serpine sind eine phylogenetisch alte Gruppe, die in Vertebraten, Arthropoden, Nematoden, Pflanzen und Viren vertreten ist. Serpine besitzen eine gemeinsame Kernstruktur von ca. 380 Aminosäuren mit Gemeinsamkeiten in der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur. Von den über 100 Mitgliedern dieser Familie sind viele erst aufgrund von cDNA-Sequenz-Homologie identifiziert worden, andere sind bereits auf der Proteinebene sehr gut charakterisiert (Gettins *et al.* 1996). Eine Einordnung in Subfamilien erfolgt anhand der innerhalb der einzelnen Gruppen konservierten Exon-Intron-Struktur (Remold-O'Donnell 1993). Zahlreiche Serpine besitzen keine inhibitorische Funktion, lassen sich jedoch eindeutig wegen ihrer Proteinstruktur und DNA-Sequenz-Homologien den Serpinen zuordnen. Das bekannteste nicht inhibitorische Serpin ist Ovalbumin, das in großer Menge in Hühnereiern vorkommt, und sich im Vergleich zu inhibitorischen Serpinen leicht in kristalliner Form darstellen läßt (Hofmeister 1892).

2.1 Medizinische Bedeutung der Serpine

Die Serpine stellen eine Proteinfamilie mit großer medizinischer Bedeutung dar (Stein & Carrell 1995). Eine Übersicht ist in Tabelle 1 gegeben. Fehlfunktionen können Störungen der Blutgerinnung, Emphyse, Leberzirrhose und bestimmte Formen von Krebs und Alzheimer zur Folge haben. Bisher so rätselhafte Krankheiten wie BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie), Creutzfeld-Jakob und Alzheimer beruhen möglicherweise auf einem gemeinsamen molekularen Prinzip, das auf einem spontanen oder induzierbaren Konformationsübergang mit nachfolgender Selbst-Aggregation und Gewebeablagerung beruht. Diese Krankheiten werden daher als *conformational diseases* bezeichnet (Carrell & Lomas, 1997). Serpine sind

allosterische Proteine und können unterschiedliche Konformationen einnehmen, die Voraussetzung für ihre biologischen (Fehl-) Funktionen sind.

Tab. 1: Beteiligung von Serpinen an der Entstehung von Krankheiten (verändert, Whisstock *et al.* 1998).

Serpin	Zielprotease	Funktion	Folgen von Fehlfunktion
Protease hemmende Serpine			
α_1 -Antitrypsin	Elastase	verhindert Gewebeabbau	(Lungen)-Emphysem (Leber)-Zirrhose
Antithrombin (AT)	Thrombin, Faktor IX, X, XI	hemmt die Blutgerinnungskaskade	Thrombose
Heparinkofaktor II	Thrombin	hemmt Blutgerinnung, (?)	Thrombose (?)
C1-Inhibitor	C1-Esterase	Kontrolle der Komplement-Kaskade	Angioödem
PAI-1	tPA, uPA	Kontrolle der Fibrinolyse	Blutungen, Thrombose
α_1 -Antichymotrypsin	Cathepsin G	verhindert Gewebeabbau	Emphysem, Alzheimer
Protease Nexin I	Thrombin, Faktor XI	(?)	Alzheimer (?)
Neuroserpin	(?)	(?)	(familiäre) Demenz
Maspin	tPA (?)	verhindert Tumorgenese	Metastasen
crmA (Kuhpocken-Virus)	Interleukin konvertierendes Enzym (?)	Virulenzfaktor	Verlust der Virulenz
SERP1 (Myxoma Virus)	tPA, uPA, Plasmin	Virulenzfaktor	Verlust der Virulenz
nicht hemmende Serpine			
Angiotensinogen		Blutdruckkontrolle	Bluthochdruck
Cortison-bindendes Globulin		Cortison-Carrier	(?)
Thyroxin-bindendes Globulin		Thyroxin-Carrier	(?)
HSP 47		Chaperon, Proteinfaltung	Fibrose (?)

2.2 Grundstruktur der Serpine

Die Kernstruktur der Serpine besteht aus drei β -Faltblättern A, B und C sowie neun α -Helices A bis I (Abb. 1 a). Die reaktive Schleife enthält an einer exponierten Stelle das reaktive Zentrum, welches von der jeweiligen Zielprotease erkannt und gespalten wird. Die beiden Aminosäurereste zu beiden Seiten der Spaltstelle werden nach der Nomenklatur von Schechter & Berger (1967) als P1 bzw. P'1 bezeichnet und ausgehend von der Spaltstelle aufsteigend nummeriert. Die zur Spaltstelle C-terminalen Aminosäuren werden mit einem Strich gekennzeichnet.

α_1 -Antitrypsin war das erste Serpin, dessen dreidimensionale Struktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte. Dieses Serpin lag in gespalteener Form vor und die Bereiche zu beiden Seiten der Spaltstelle befanden sich an entgegengesetzten Enden des Moleküls, wobei ein Abschnitt der reaktiven Schleife Teil eines β -Faltblattes war (Loeberman *et al.* 1984). Die exponierte Position der ungespaltenen reaktiven Schleife, die bei inhibitorischen Serpinen das reaktive Zentrum enthält, wurde erst durch die Röntgenstrukturanalyse

von Ovalbumin erkannt (Stein *et al.* 1990 und 1991). Seitdem sind weitere Serpine auf diese Weise in ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärt worden, so daß sich ein immer vollständigeres Bild ihrer verschiedenen allosterischen Zustände abzeichnet (Whisstock *et al.* 1998).

2.3 Konformationszustände der Serpine

Die Spaltung des reaktiven Zentrums wird von einer Konformationsänderung des Serpins begleitet, die zu einer größeren Thermostabilität und zum Verlust der Inhibitor-Aktivität führt. Diese Konformationsänderung wird als S→R-Übergang (*stressed* → *relaxed*) bezeichnet. Verschiedene Konformationszustände konnten bereits durch Röntgenstrukturanalysen (Abb. 1b) sichtbar gemacht werden.

Viele Serpine liegen im nativen Zustand als S-Zustand „gespannt“ vor. Sie sind thermodynamisch gesehen metastabil und gelangen nach Spaltung des reaktiven Zentrums in einen erheblich stabileren Zustand. Dabei inseriert der N-terminale Teil der reaktiven Schleife (P1 bis P14) in das β -Faltblatt A, das in seiner nunmehr antiparallelen Struktur energetisch begünstigt vorliegt.

Bei manchen Serpinen kann die reaktive Schleife auch ohne Spaltung partiell oder vollständig in das β -Faltblatt A inserieren. Letztere Konformation wird als latent (Abb. 1b) bezeichnet und ist inaktiv.

Für die Insertion muß sich das geschlossene β -Faltblatt A öffnen, um Platz für den Strang 4 zu schaffen, so daß die allosterische Konformationsänderung fast alle Teile des Moleküls einschließt. Für diesen Mechanismus sind bestimmte Teile des Moleküls von besonderer Bedeutung: Die proximalen und distalen Scharnier-Regionen (*hinge*) zu beiden Enden der reaktiven Schleife sowie die Verschluß-Domäne (*shutter*) vor α -Helix B unter dem β -Faltblatt A (Abb. 1a). Hier können bereits Punktmutationen zu dramatischen Fehlfunktionen führen (Stein & Carrell 1995). Auch die Beweglichkeit von α -Helix F und deren Verbindungsschleife zu β -Strang A3 spielt offensichtlich eine wichtige Rolle (Gooptu *et al.* 2000, Lee *et al.* 2000).

Serpine sind aufgrund des beschriebenen Mechanismus anfällig für *conformational diseases*, da das Faltblatt A auch geeignete Peptid-Stränge eines weiteren Proteinmoleküls akzeptiert und sich dadurch Polymere bilden können. Bei bestimmten Serpin-Varianten kann dies bereits durch eine Temperaturerhöhung von 2-3 °C induziert werden (Carrell & Lomas, 1997). Durch Insertion der reaktiven Schleife eines aktiven Serpin-Moleküls in das β -Faltblatt A eines zweiten Moleküls entstehen *loop-sheet*-Polymere, deren Aggregate zu bestimmten Formen von Thrombose (Bruce *et al.* 1994), Leberzirrhose (Lomas *et al.* 1992) Lungenemphysem (Gooptu *et al.* 2000), Krebs (Liu *et al.* 1999) und Demenz (Davis *et al.* 1999) führen können. Die Insertion einer geeigneten Peptidsequenz eines Fremdproteins in das β -Faltblatt A inaktiviert das Serpin und trägt im Falle von α_1 -Antichymotrypsin möglicherweise zur Entstehung von Alzheimer bei (Janciauskiene & Wright 1998).

a)

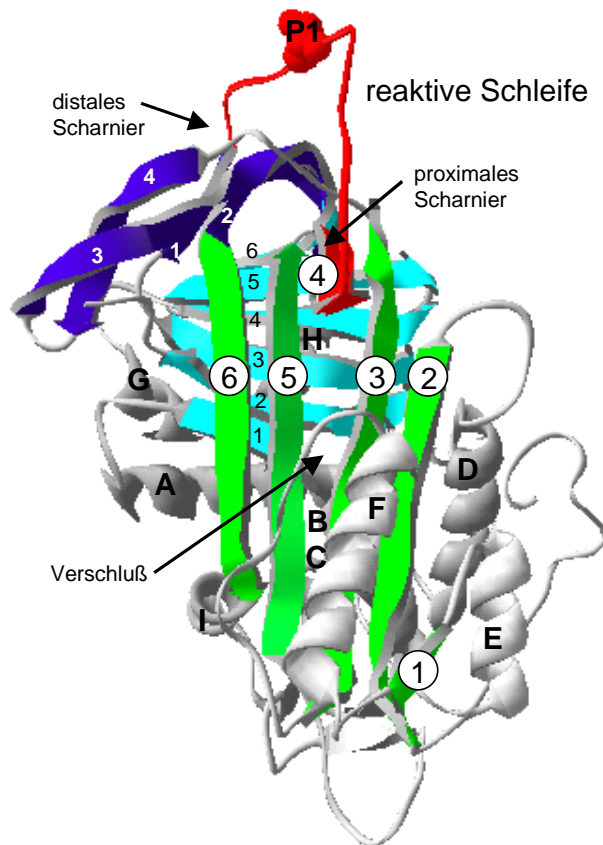
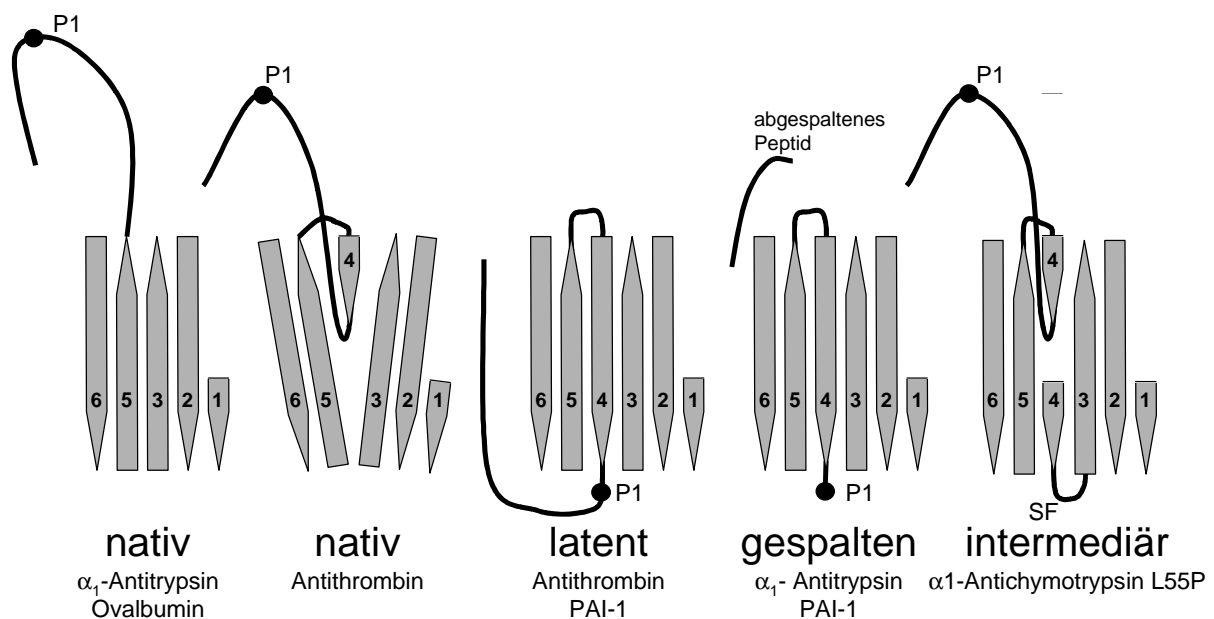


Abb. 1: a) Grundstruktur der Serpine am Beispiel von Antithrombin. rot: Reaktive Schleife mit P1-Aminosäure des reaktiven Zentrums (P1-P'1); grün: β -Faltblatt A mit 6 Strängen; hellblau: β -Faltblatt B mit 6 Strängen; violett: β -Faltblatt C mit 4 Strängen; A bis I: α -Helices. Ein Teil der reaktiven Schleife ist in das β -Faltblatt A als β -Strang 4 bereits inseriert. Durch vollständige Insertion gelangt das Molekül in einen thermodynamisch begünstigten stabilen Zustand. PDB-Datei 2ant (Skinner *et al.* 1997) mit Swiss-PDB-Viewer 3.6b3 bearbeitet.

b) Schema der Konformations-Zustände von Serpinen, die durch Röntgenstrukturanalysen belegt sind. Dargestellt ist das β -Faltblatt A mit reaktiver Schleife, welche das reaktive Zentrum mit der P1-Aminosäure enthält. Der Zustand mit voll- oder teilsexponierter reaktiver Schleife (nativ) entspricht der aktiven Form der Serpine, während der latente und gesplante Zustand inaktiv ist. Ein intermediärer Zustand wurde durch Röntgenstrukturanalyse einer Mutante (L55P) von α_1 -Antichymotrypsin entdeckt (Gooptu *et al.* 2000). Es inseriert dort eine Verbindungsschleife zwischen Helix F und β -Strang A3 (SF) in das β -Faltblatt A. PAI-1: Plasminogenaktivator-Inhibitor-1.

(erweitert, nach Whisstock *et al.* 1998)

b)



2.4 Mechanismus der Protease-Inhibition

Der Ablauf der Protease-Inhibition wird durch den in Abbildung 2 skizzierten *branched-pathway*-Mechanismus (Lawrence *et al.* 1995 und 2000) beschrieben. Um eine Protease zu inhibieren, verhält sich das Serpin wie ein geschickter Angler. Der Raubfisch (Protease) wird durch einen attraktiven Köder (Pseudosubstrat, reaktive Schleife) verleitet zuzubeißen (Spaltung der P1-P'1-Bindung). Dies bemerkt der Angler und zieht schnell an der Angel (beginnende Insertion der reaktiven Schleife, S→R-Übergang), so daß sich der Haken (P1-Rest) im Maul (aktives Zentrum der Protease) verfängt. Um den Fisch nicht zu verlieren, hält der Angler die Schnur dauerhaft unter Spannung, um ein Loslösen des Hakens zu verhindern (kovalenter Serpin-Enzym-Komplex mit vollständig inserierter reaktiver Schleife). Reagiert der Angler zu langsam, kann sich der Raubfisch lösen (Deacylierung) und hinterläßt den Angler mit eingezogener Schnur und zerstörtem Köder (inaktives Serpin mit gespaltener und inserierter reaktiver Schleife).

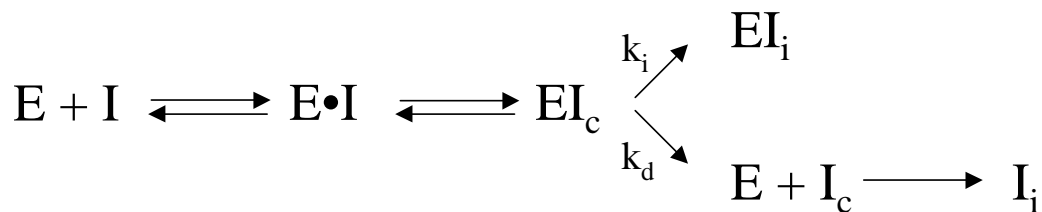


Abb. 2: *Branched-pathway*-Mechanismus der Serinprotease-Inhibition durch Serpine. Das proteolytische Enzym E bindet reversibel die reaktive Schleife vom Serpin I in einem nicht kovalenten Begegnungs-(Michaelis)-Komplex (E•I). Dieser Komplex kann wieder dissoziieren oder nach Spaltung der P1-P'1-Bindung als Acyl-Intermediat (EI_c) einen kovalenten Komplex bilden. Das Serpin ist mit dem P1-Rest an das Serin des aktiven Zentrums der Protease gebunden. Dieser Zustand wird durch Insertion der reaktiven Schleife in das β-Faltblatt A kinetisch stabilisiert (EI_i), vermutlich durch eine sterische Verzerrung des aktiven Zentrums der Protease. Alternativ kann das Serpin gespalten werden (I_c) und verhält sich damit wie ein gewöhnliches Peptid-Substrat. Die gespaltene reaktive Schleife inseriert ebenfalls in das β-Faltblatt A des nun inaktiven Serpins (I_i). Welche der alternativen Wege bevorzugt eingeschlagen wird, hängt von der Geschwindigkeit (k_i) der Insertion der reaktiven Schleife ab (Lawrence *et al.* 2000).

Obwohl der von Lawrence *et al.* (1995) vorgeschlagene Inhibitionsmechanismus experimentell vielfach bestätigt wurde (Stone & Le Bonniec 1997, Stratikos & Gettins 2000, Lawrence *et al.* 2000), gibt es bislang nur eine Röntgenstrukturanalyse eines Serpin-Enzymkomplexes. Nach 20-jährigen Bemühungen ist es erstmals Huntington *et al.* (2000b) gelungen, einen Serpin-Enzym-Komplex zu kristallisieren und der Röntgenstrukturanalyse zuzuführen. Diese Röntgenstruktur erweitert die bisherigen Modellvorstellungen um die Erkenntnis, daß die Protease im Komplex weitgehend deformiert vorliegt (Abb. 3).

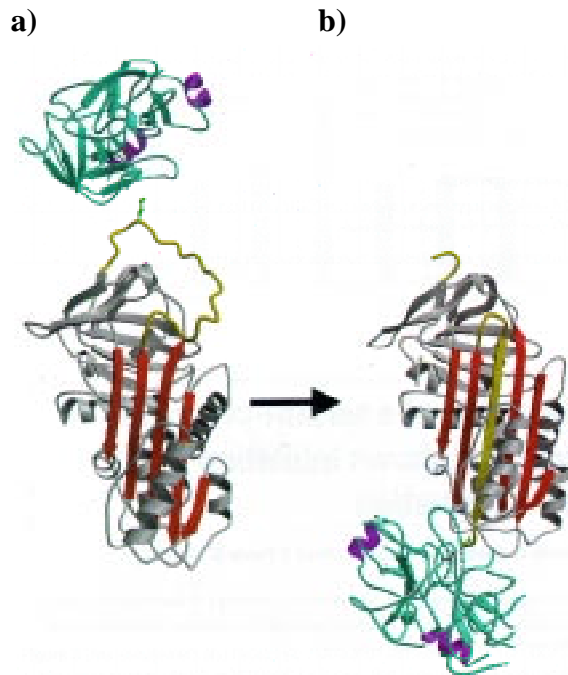


Abb. 3: Bildung des Serpin-Enzym-Komplexes. (entnommen aus: Huntington *et al.* 2000b)

a) Trypsin (oben) und α_1 -Antitrypsin vor der Komplexbildung in entsprechender Ausrichtung zueinander. rot: β -Faltblatt A, gelb: reaktive Schleife mit P₁-Seitenkette (grün).

b) Serpin-Enzym-Komplex. Man erkennt die vollständige Insertion der reaktiven Schleife des α_1 -Antitrypsins in das β -Faltblatt A. Der P₁-Rest der reaktiven Schleife ist mit dem katalytischen Serin der Protease verestert. Während der Komplexbildung hat das über P₁ Serpin-gebundene Enzym eine Translationsbewegung um das Serpin herum beschrieben. Das thermodynamisch hyperstabile gespaltene Serpin ist in der Lage die Protease im Komplex weitgehend zu deformieren, wobei nicht nur das Serin aus der katalytischen Triade gezogen wird, sondern 37 % des Enzyms seine ursprüngliche Konformation verliert. Die nun partiell denaturierte Protease ist dadurch ihrerseits erheblich stärker proteolytisch angreifbar, was evtl. zu einem lokalen Abbau des Komplexes am Entstehungsort beiträgt.

2.5 Heparin-bindende Serpine

Heparin ist ein anionisches Polysaccharid und gehört zu den GAGs, die in Abschnitt I.4.2 beschrieben sind. Neben HCII gibt es weitere Heparin-bindende Serpine, und zwar Protease-Nexin-1, Protein-C-Inhibitor (PCI), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und Antithrombin (AT). Letzteres bietet die meisten Parallelen zu HCII und der Aktivierungsmechanismus ist am besten aufgeklärt (s. Abschn. I.3.4.1). Bei HCII, AT, Protease-Nexin-1 und PAI-1 liegt die Heparin-Bindungsstelle im Bereich der α -Helix D (vergl. Abb. 1a, 68 und 69) und deren Umgebung (α -Helix A), während die Heparin-Bindung bei PCI im Bereich der α -Helices H und A erfolgt (Pratt *et al.* 1992, Gettins *et al.* 1996).

3 Heparinkofaktor II

3.1 Geschichte von Heparinkofaktor II

Heparin, ein Kohlenhydrat-Polyanion (s. Abschnitt I.4.2), ist ein potenter Inhibitor der Blutgerinnung und wird therapeutisch zu diesem Zweck eingesetzt. Diese Wirkung wird durch zwei Plasma-Proteine vermittelt, die erstmals von Briginshaw & Shanberge (1974) getrennt und partiell aufgereinigt wurden. Die damals als Heparinkofaktor A und B bezeichneten Proteine sind in Gegenwart von Heparin wirkungsvolle Inhibitoren von Thrombin, das die Blutgerinnung durch Fibrinogen-Spaltung auslöst. Heparinkofaktor B stellte sich als identisch mit AT heraus, während Heparinkofaktor A, nun als Heparinkofaktor II bezeichnet, von Tollefsen *et al.* 1982 erstmals gereinigt und näher charakterisiert wurde. Die Primärstruktur von HCII

konnte durch Sequenzieren der cDNA von Ragg 1986 aufgeklärt werden, wobei es auf Grund der Zugehörigkeit zu den Serpinen und einem Leucin-Rest in der P1-Position zunächst als Leuserpin-2 bezeichnet wurde. Der zunächst rätselhafte Inhibitionsmechanismus gegenüber Thrombin konnte 1990 nach Mutationsstudien durch ein bis heute gültiges Modell erklärt werden (Ragg *et al.* 1990a,b).

Tab. 2: Übersicht über die Eigenschaften von humanem Heparinkofaktor II

Eigenschaft		Ref.
Aminosäuren	480	Ragg 1986
Molekularmasse	65.6 kD	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
Stokes-Radius	3,4 nm	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
Kohlenhydratanteil	10 % (w/w)	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
Isoelektrischer Punkt (pI)	4.95-5.15	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
potentielle N-Glykosylierungsstellen	Asn30, Asn169, Asn368	Ragg 1986
Tyrosin-Sulfatierungen	Tyr60, Tyr73	Hortin <i>et al.</i> 1986
Cysteine/Disulfidbrücken	3/0	Ragg 1986/Church <i>et al.</i> 1987
Extinktionskoeffizient	0,593 ml mg ⁻¹ cm ⁻¹	Church <i>et al.</i> 1987
Gen-Ort	Chromosom 22q11	Herzog <i>et al.</i> 1991
Gen-Struktur	5 Exons, 4 Introns	Ragg & Preibisch 1988
Serpin-Einordnung	α_1 -Antitrypsin-Subfamilie	Ragg & Preibisch 1988
Plasma-Konzentration	90 μ g/ml (1,37 μ M)	Tollefsen <i>et al.</i> 1982

3.2 Genstruktur von Heparinkofaktor II

Das HCII-Gen auf Chromosom 22q11 umfaßt 15 kB und enthält 5 Exons und vier Introns (Ragg & Preibisch 1988, Herzog *et al.* 1991). Da die Genstruktur innerhalb der Serpine nicht einheitlich ist, lassen sich enger verwandte Serpine aufgrund konservierter Exon-/Intron-Muster in Subfamilien zusammenfassen (Remold-O'Donnell 1993). HCII gehört, obwohl die Exon-Intron-Struktur von HCII zwischen verschiedenen Spezies etwas variiert (Kamp & Ragg 1999), zur α_1 -Antitrypsin Subfamilie (Ragg & Preibisch 1988, Ragg *et al.* 2001).

3.3 Protein-Struktur von Heparinkofaktor II

HCII besteht aus 480 Aminosäuren (Tab. 2) und besitzt 3 Cysteine, die jedoch anders als bei AT keine Disulfidbrücken ausbilden. Mit Hilfe der bereits durch Röntgenstrukturanalyse bekannten Serpine kann ein dreidimensionales Modell (Abb. 69 in Abschn. IV.5.1) von HCII berechnet werden (s. Abschnitt II.6). Für die aminoterminalen 80 Aminosäuren gibt es allerdings keine Homologie zu anderen Serpinen, so daß es für deren Sekundär- und Tertiärstruktur keine Hinweise gibt. Dieser N-Terminus ist jedoch für die Heparin- und Dermatansulfat-katalysierte Thrombin-Inhibition entscheidend.

Humanes HCII besitzt aufgrund der Konsensus-Sequenz (s. Abschn. I.5.1) drei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Asparaginresten 30, 169 und 368, wobei die letzten beiden

(169, 368) in den bisher bekannten HCII-Sequenzen (Mensch, Kaninchen, Ratte, Maus, Frosch und Huhn) konserviert sind (Colwell & Tollefsen 1998).

Bei HCII ist der P1-Rest, der normalerweise die Protease-Spezifität von Serpinen wesentlich mitbestimmt, ein Leucin-Rest. Dies ist für ein Thrombin-inhibierendes Serpin ungewöhnlich, da das aktive Zentrum von Thrombin einen Arginin-Rest deutlich bevorzugt. Serpine mit Leucin in P1-Position hemmen eigentlich bevorzugt α_1 -Chymotrypsin und Cathepsin G, was auch für HCII nachgewiesen wurde. GAGs haben jedoch keinen Einfluß auf diese Reaktion (Church *et al.* 1985). Da α_1 -Chymotrypsin ein Verdauungsenzym des Dünndarmes ist, kommt es als physiologisches Zielprotein des im Plasma und Gewebe lokalisierten HCII vermutlich nicht in Frage. Tauscht man bei HCII den Leucin-Rest 444 gegen Arginin aus, ändert sich die Spezifität dieser HCII-Mutante in Abwesenheit von GAGs von α_1 -Chymotrypsin zu Thrombin (Derechin *et al.* 1990). Erst durch die Wechselwirkung mit GAGs wie Heparin und Dermatansulfat wandelt sich Wildtyp-HCII zu einem hochspezifischen und -effizienten Thrombin-Inhibitor.

Für die Bindung der polyanionischen GAGs konnten bestimmte basische Aminosäuren identifiziert werden. Diese liegen, wie auch teilweise bei AT, im Bereich der α -Helix D. Die Aminosäuren Lysin 173, Arginin 184 und Lysin 185 binden Heparin, während Arginin 184, Lysin 185, Arginin 189, 192 und 193 Dermatansulfat binden (Blinder *et al.* 1989, Ragg *et al.* 1990a,b, Blinder & Tollefsen 1990, Whinna *et al.* 1991). Andere Polyanionen wie Pentoanphosphat, Fucoidan oder Dextranulphat binden ebenfalls an diese Domäne (Colwell *et al.* 1999).

Die ersten 80 Aminosäuren des Aminoterminus von HCII besitzen zwar keine Homologie zu anderen Serpinen, enthalten jedoch zwei benachbarte saure Sequenzen, die eine Ähnlichkeit mit dem C-Terminus von Hirudin aufweisen (Abb. 4).

Hirudin ist ein Thrombin inhibierendes Protein und der gerinnungshemmende Wirkstoff des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis* (Marquardt 1994). Es besteht aus einer 65 Aminosäuren langen Polypeptidkette (Molekularmasse 7 kD), das mit seinem N-Terminus die aktive Spalte von Thrombin blockiert, während der C-Terminus über mehrere Salzbrücken an die Fibrinogen-bindende Exosite I von Thrombin bindet (Bode & Huber 1992, Toschi *et al.* 1996). Der Tyrosin-Rest 67 von Hirudin ist sulfatiert und trägt zur Thrombin-Bindung bei, da desulfatiertes Hirudin eine 3- bis 10-fach reduzierte Affinität besitzt (Chang 1983).

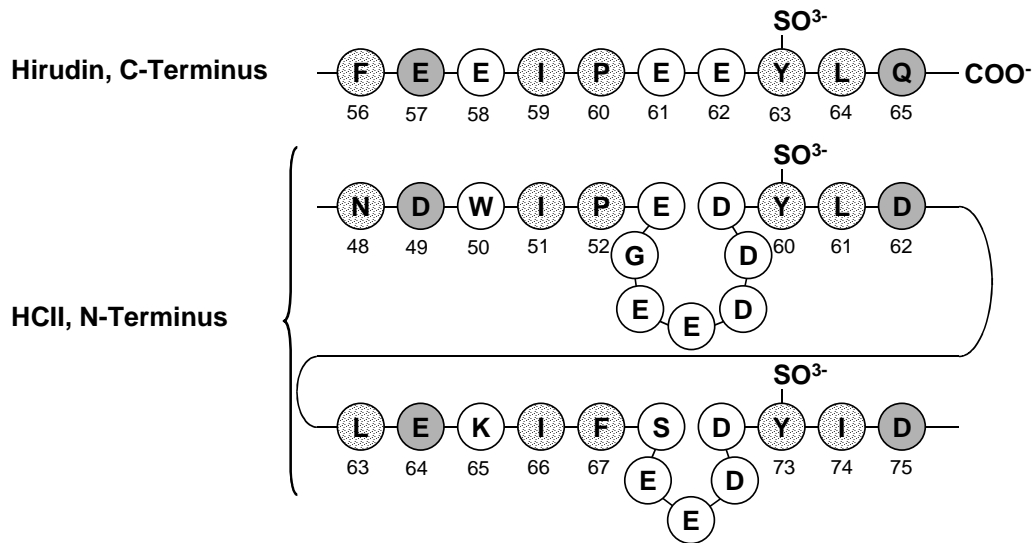


Abb. 4: Ähnlichkeit der N-terminalen sauren Domäne von HCII zum C-Terminus von Hirudin. Aus der Röntgenstrukturanalyse eines Hirudin-Thrombin-Komplexes sind die Aminosäuren von Hirudin bekannt, die mit der Exosite I von Thrombin Kontakt haben. Ionische Kontakte: grau, hydrophobe Kontakte: gepunktet. Analoge Aminosäuren im HCII sind in gleicher Weise gekennzeichnet (nach Van Deerlin & Tollefsen 1991).

3.4 Aktivierung von Heparinkofaktor II durch Heparin bzw. Dermatansulfat

Die Thrombin-Inhibition wird durch bestimmte GAGs mehr als 1000fach beschleunigt. HCII bindet Heparin im Vergleich zu AT mit geringerer Affinität und benötigt eine 10fach größere Konzentration, um die volle Aktivierung zu erreichen. HCII läßt sich aber im Gegensatz zu AT in gleichem Ausmaß auch durch Dermatansulfat aktivieren (Tollefsen *et al.* 1983). Für den Inhibitions-Mechanismus spielt der N-Terminus von HCII eine entscheidende Rolle, der im nicht aktivierten HCII die GAG-Bindungsstelle bedeckt (Abb.5a). Durch die Bindung von GAGs wird eine Konformationsänderung induziert (Abb. 5b), in deren Folge der N-Terminus an Thrombin binden kann (Ragg *et al.* 1990a, b). Von den beiden sauren Sequenzen der sauren Domäne von HCII scheint hauptsächlich die N-terminale an Thrombin zu binden, während der benachbarte (weiter C-terminale) saure Bereich zur intramolekularen Bindung beiträgt (Ragg *et al.* 1990b, Van Deerlin & Tollefsen 1991).

Bei der Aktivierung durch Dermatansulfat scheint diese Konformationsänderung ausgeprägter zu sein als bei Heparin (Liaw *et al.* 1999). Durch diesen Verdrängungs-Mechanismus steigt die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_2 von $4,6 \times 10^4$ auf $6-7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Pratt *et al.* 1989). Anders als beim AT (s. Abschnitt I.3.4.1) hat die GAG-Bindung kaum Auswirkung auf die Konformation der reaktiven Schleife (Liaw *et al.* 1999).

Thrombin besitzt zu beiden Seiten des aktiven Zentrums anionenbindende Domänen (Exosites), wobei Exosite I u. a. den N-Terminus von HCII bindet und Exosite II die Heparinbindungsstelle von Thrombin darstellt (Abb. 6).

Ein für HCII vorgeschlagener Doppelbrücken-Mechanismus (Van Deerlin & Tollefsen 1991), bei dem sowohl der N-Terminus als auch das GAG-Polymer beide Moleküle verbinden, leis-

tet bei der Heparin-aktivierten Thrombin-Inhibition durch HCII nur einen geringen Beitrag, und bei der Dermatansulfat-aktivierten gar keinen (Sheehan *et al.* 1994).

Neben diesem (Abb. 5) vielfach belegten Mechanismus (Liaw *et al.* 1999) gibt es Hinweise auf eine unabhängig vom N-Terminus erfolgende allosterische Aktivierung von HCII durch das sulfatierte Polysaccharid Calcium-Spirulan, bei der wiederum die Exosite I von Thrombin beteiligt ist (Hayakawa *et al.* 2000). Weiterhin scheint ein substituiertes Dextranpolymer (CMDDBS), das offenbar keine Affinität zu HCII besitzt, durch Bindung an Thrombin die Inhibition mittels HCII zu katalysieren (Maaroufi *et al.* 1997).

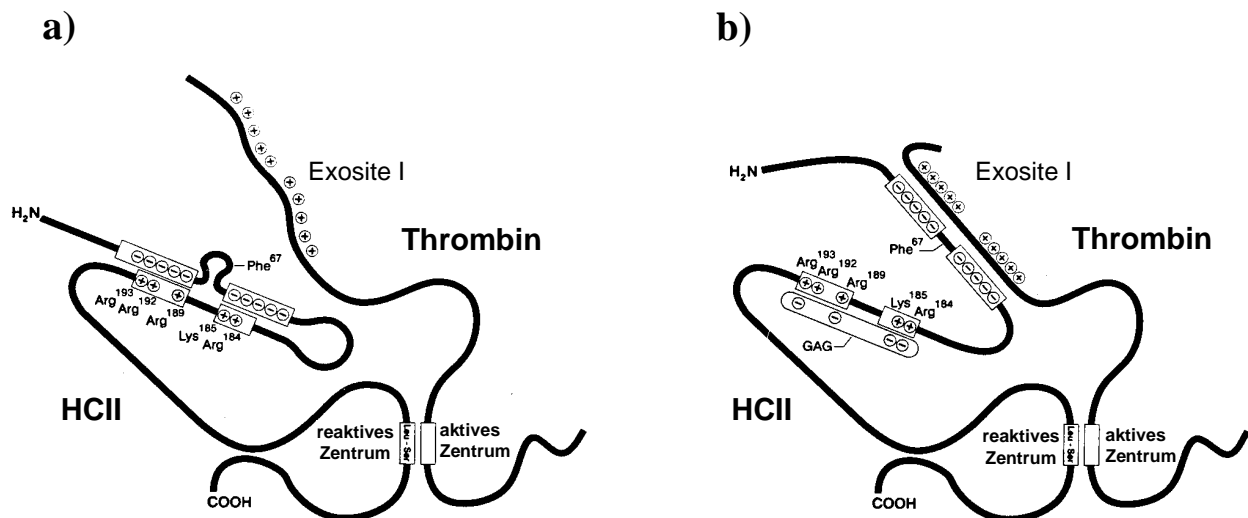


Abb. 5: Modell der Thrombin-Inhibition durch allosterische Konformationsänderungen von HCII. **a)** Die saure Domäne des N-Terminus bindet intramolekular über ionische Wechselwirkungen an die basische GAG-Bindungsstelle von HCII. Das reaktive Zentrum kann wegen des für Thrombin ungeeigneten Leucin-Restes in der P1-Position nur sehr langsam mit Thrombin reagieren.

b) Durch die Bindung von GAGs wird der N-Terminus von seiner intramolekularen Bindungsstelle kompetitiv verdrängt. Der freigesetzte N-Terminus kann an die Exosite I von Thrombin binden und bildet so zusätzlich zum reaktiven Zentrum eine zweite Kontaktstelle. (verändert übernommen aus Ragg *et al.* 1990a)

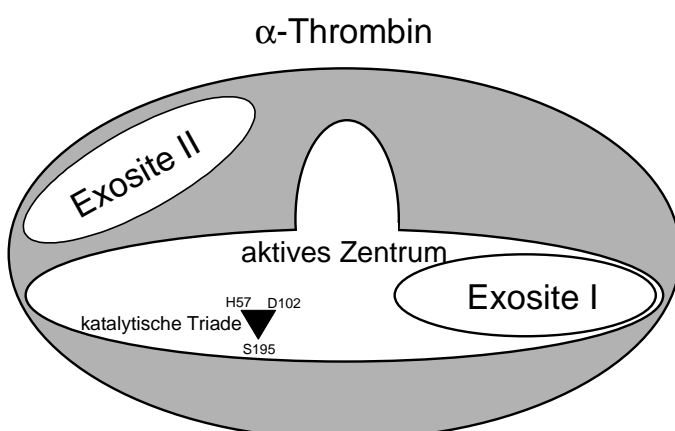


Abb. 6: Schematische Darstellung von Thrombin. Das proteolytisch aktive α -Thrombin entsteht durch Spaltung des 579 Aminosäuren langen Prothrombins durch Faktor Xa. Es besteht aus einer A-Kette (36 Aminosäuren) und einer über eine Disulfidbrücke gebundenen B-Kette (259 Aminosäuren), die das aktive Zentrum enthält. Das aktive Zentrum erkennt spezifisch das Zielprotein Fibrinogen. Thrombin besitzt zwei Anionen-bindende Domänen (Exosites). Exosite I befindet sich am Rand der aktiven Spalte und ist an der Fibrinogenbindung beteiligt. Weiterhin bindet sie den C-Terminus von Hirudin und die N-terminale saure Domäne von HCII. Exosite II bindet Heparin. (Bode *et al.* 1992, Stubbs & Bode 1995)

3.4.1 Mechanismus der Thrombin-Hemmung durch Antithrombin

Das mit HCII verwandte Antithrombin (AT) besitzt keinen Thrombin-bindenden N-Terminus. Die Aktivierung geschieht über Heparin, das an AT und Thrombin bindet. Die Bindung von Heparin an AT bewirkt über ein elektrostatisches Netzwerk der α -Helices D und F sowie des β -Faltblattes A eine Konformationsänderung, bei der die teilinsertierte reaktive Schleife (s. Abb. 1a) das β -Faltblatt A verläßt und dadurch weiter exponiert wird (Huntington *et al.* 2000a). Diese Heparin-Aktivierung steigert die Inhibition von Faktor Xa, wohingegen die Thrombin-Inhibition hauptsächlich durch eine Brückenbildung (*template*-Mechanismus) zwischen AT und dem ebenfalls Heparin-bindenden Enzym katalysiert wird (Olson *et al.* 1992, Van Boeckel *et al.* 1994). AT bindet dabei spezifisch und fest an eine definierte, aber relativ seltene Sequenz innerhalb des Heparin- oder Heparansulfat-Polymers (s. Abschnitt I.4) und liegt dadurch ortsgebunden aktiviert vor. Thrombin besitzt keine solche Sequenzspezifität und kann sich deshalb frei durch Diffusion entlang des Polymers bewegen, so daß es sterisch korrekt ausgerichtet auf den aktivierten Inhibitor trifft und ein ternärer Komplex entsteht (Olson & Björk 1991).

3.5 Physiologie von Heparinkofaktor II

Menschliches Blut enthält ca. 90 $\mu\text{g/ml}$ HCII, das hauptsächlich von Leberzellen sekretiert wird (Tollefsen *et al.* 1982). Im Kaninchen-Modell befinden sich 20 % des HCII im intravaskulären Raum, während 63 % extravaskulär verteilt sind. Damit ist HCII mehr auf den extravasalen Raum verteilt als AT, das 30% intravaskular und 56 % extravaskular vorliegt (Hatton *et al.* 1997). Außer in Hepatozyten (Ragg 1986, Blinder *et al.* 1988) wurde HCII-mRNA auch in anderen Geweben (Schmidt 1997, Kamp *et al.* 2001) gefunden. Die physiologische Bedeutung von HCII ist bisher unklar. Als Thrombin-Inhibitor besitzt HCII im Blutplasma eine gerinnungshemmende Funktion (Abb. 7), die allerdings in größerem Umfang von AT wahrgenommen wird, da HCII lediglich 20 % des Thrombins inhibiert. Dieser Anteil steigt jedoch, wenn eine AT-Defizienz vorliegt oder eine höhere Dermatansulfat-Konzentration im Plasma vorliegt (Liu *et al.* 1995). HCII kann AT jedoch nicht in seiner anti-koagulativen Wirkung vollständig ersetzen (Griffith *et al.* 1983) und bei Gefäßverletzung ist AT der aktivere Thrombin-Inhibitor (Hatton *et al.* 1999).

HCII vermag, anders als AT, in Gegenwart von Dermatansulfat Thrombus-gebundenes Thrombin zu inaktivieren (Bendayan *et al.* 1994). Allerdings ist fibrin-gebundenes Thrombin, wie es im Thrombus vorliegen dürfte, gegenüber der Heparin-abhängigen Inhibition durch AT und HCII geschützt (Becker *et al.* 1999). Fibrinogen wiederum setzt im Plasma die Dermatansulfat-katalysierte Thrombinhemmung durch HCII herab. Dies läßt sich durch die Konkurrenz zwischen Fibrinogen und dem N-Terminus von HCII um die gleiche Bindungsstelle (Exosite I) auf Thrombin erklären (Dawes & Zammit 1995).

Für weitere Funktionen von HCII außerhalb des hämostatischen Systems gibt es Hinweise: HCII ist mit Makrophagen assoziiert, bindet selektiv Progesteron und inaktiviert den Kom-

plementfaktor D (Adipsin) (Geiger *et al.* 1997). Eine Bindung von HCII an Erythrozyten wurde beschrieben (Chitolie *et al.* 1996), und ein durch Elastase abgespaltenes Peptid (Asp 49-Tyr 60) von HCII wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Monozyten (Church *et al.* 1991).

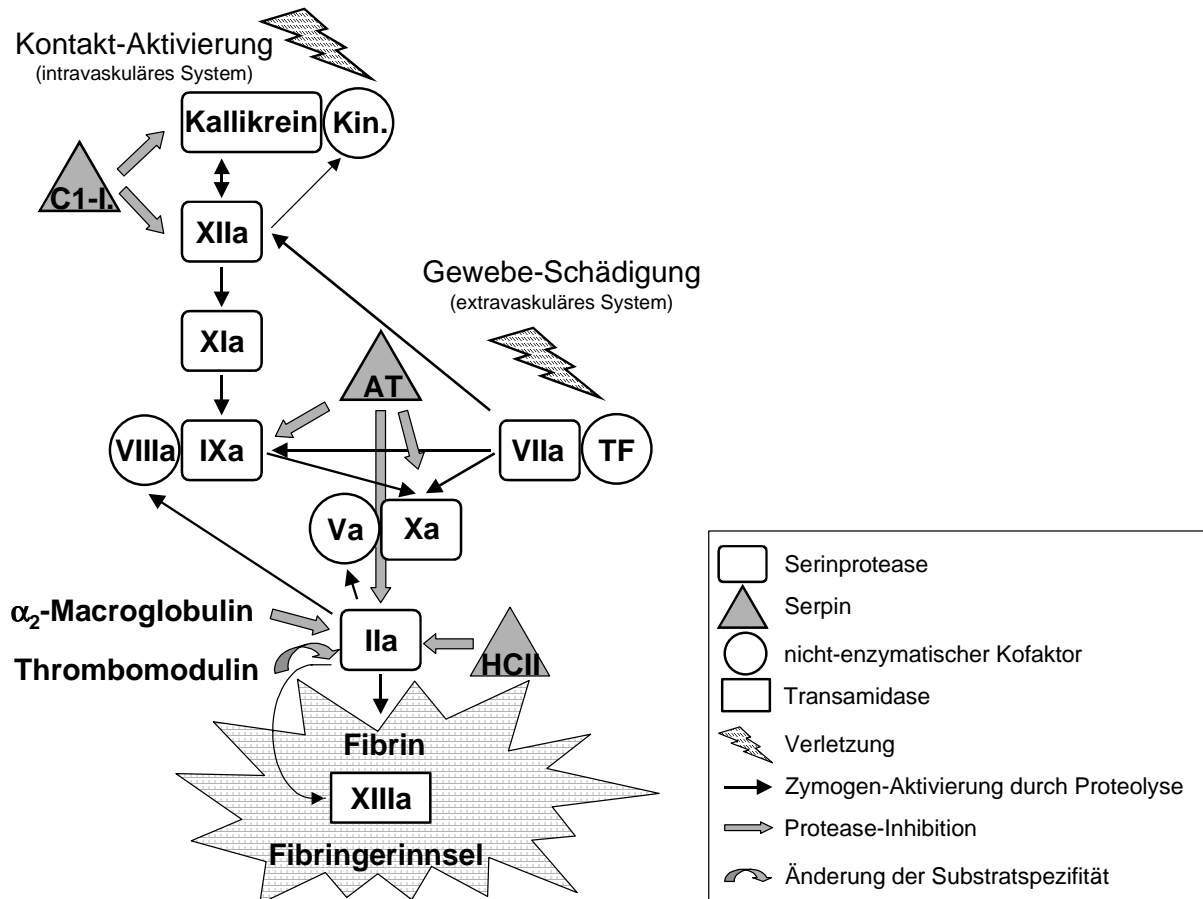


Abb. 7: Schema der Blutgerinnung. Faktor IIa (Thrombin), das zentrale Protein der Blutgerinnung, löst durch die Spaltung von Fibrinogen die Bildung eines Fibringerinnsels aus. Thrombin wird durch zahlreiche Modulatoren präzise reguliert. Es wird durch 3 Inhibitoren gehemmt und Thrombomodulin wandelt es in eine antikoagulative wirkende Protease um. Antithrombin (AT) ist der physiologisch wichtigste Inhibitor der Blutgerinnung, da es neben Thrombin weitere prokoagulative Faktoren hemmt. HCII besitzt eine engere Spezifität und hemmt ausschließlich Thrombin. Gezeigt sind nur die aktivierten Gerinnungsfaktoren.

1 % aller Individuen besitzen durch eine heterozygote Defizienz eine deutlich reduzierte Plasma-HCII-Konzentration (<60 %), ohne jedoch ein erhöhtes Thromboserisiko zu besitzen. Von Thrombose-Patienten besitzen wiederum nur 1 % einen reduzierten HCII-Spiegel (Bertina *et al.* 1987). Eine erbliche homozygote HCII-Defizienz scheint nur dann zu einem erhöhten Thrombose-Risiko zu führen, wenn gleichzeitig die AT-Konzentration reduziert ist (Villa *et al.* 1999).

Erhöhte HCII-Werte finden sich während der Schwangerschaft, bei der Einnahme oraler Kontrazeptiva (Massouh *et al.* 1989, Mackie *et al.* 1990) sowie bei nephrotischem Syndrom (Toulon *et al.* 1992) und tiefer Venenthrombose (Toulon *et al.* 1991).

Erniedrigte Werte findet man bei Fehlfunktionen der Leber (Tollefsen & Pestka 1985), bei Prä-Eklampsie, einer mit Bluthochdruck und Proteinurie verbundenen Schwangerschafts-Gestose (Bellart *et al.* 1998) sowie bei HIV-Infizierten (Toulon *et al.* 1993). Obwohl HCII als Akut-Phasen-Protein eingestuft wurde (Toulon *et al.* 1991), konnte keine durch Entzündungsmediatoren (IL-6, IL1- β , TNF- α , LPS-stimulierte Monocyten) erhöhte HCII-Synthese in kultivierten Hepatocyten festgestellt werden (Koike *et al.* 1996).

Derivatansulfat ist als vorbeugendes Mittel gegen venöse Thromboembolien nach Krebs-Operationen wirkungsvoller als Heparin (Di Carlo *et al.* 1999), da es zur Auflösung bereits bestehender Thromben beitragen kann, ohne die allgemeine Gerinnungsfähigkeit wesentlich zu beeinträchtigen (Colucci *et al.* 1997).

Um die physiologische Funktion von HCII als Thrombininhibitor besser zu verstehen, muß man die zahlreichen physiologischen Funktionen von Thrombin berücksichtigen, die potentiell von HCII reguliert werden. Beispielsweise unterdrückt HCII in Gegenwart von Derivatansulfat die Thrombin-induzierte Freisetzung von Plasminogen-Aktivator (tPA), PlasminogenAktivator-Inhibitor I (PAI-1) und Prostacyclin aus Endothelzellen (Kaji *et al.* 1990 und 1989) und hebt dadurch die fibrinolytische und Thrombozytenaggregation hemmende Wirkung von Thrombin auf.

Die meisten zellulären Thrombin-Effekte (Abb. 8) stehen im Zusammenhang mit Gewebereparatur-Mechanismen (Goldsack *et al.* 1998). Auch bei zahlreichen pathologischen Prozessen spielt Thrombin eine wichtige Rolle. Zu hohe Thrombinkonzentrationen zur falschen Zeit am falschen Ort sind an Thrombosen beteiligt, an chronischen Entzündungen (rheumatoider Arthritis, Glomerulonephritis, Lungen-Fibrose), neurodegenerativen Krankheiten (z.B. Alzheimer) sowie am Tumorstadium (Goldsack *et al.* 1998).

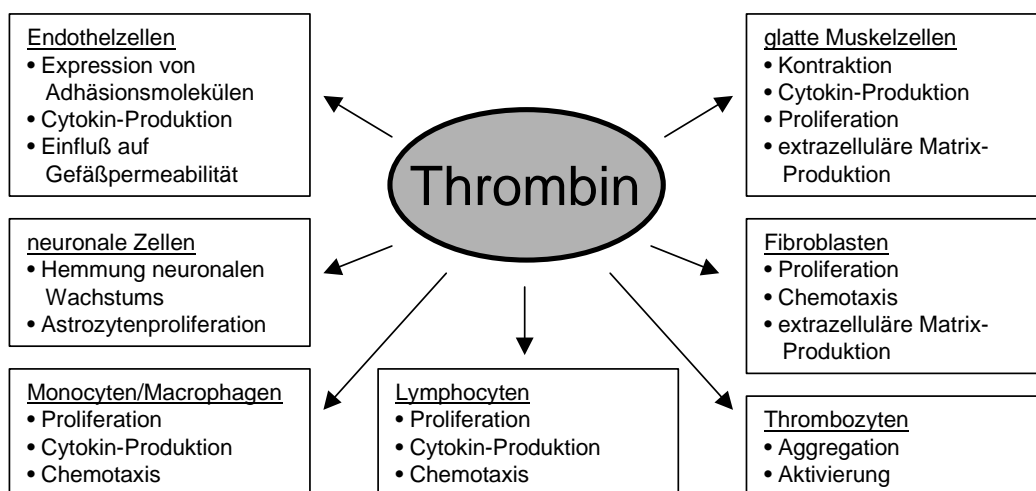


Abb. 8: Physiologische Effekte von Thrombin auf zellulärer Ebene (nach Goldsack *et al.* 1998).

3.5.1 Clearing

Im Plasma zirkulierendes HCII hat eine Halbwertszeit von 2,5 Tagen (Sie *et al.* 1985). Thrombin-HCII-Komplexe (THCII) liegen im Plasma überwiegend an Vitronectin, einem 78 kD Glykoprotein, gebunden vor (Liu *et al.* 1995). Die von Proteindisulfid-Isomerase katalysierte Bindung von Vitronectin an den Serpin-Enzym-Komplex erfolgt dabei evtl. über Disulfidbrücken zwischen Thrombin und Vitronectin, wie beim ternären Vitronectin-Thrombin-Antithrombin-Komplex gezeigt werden konnte (Essex *et al.* 1999). Freies HCII dürfte in Abhängigkeit vom Sialylierungsstatus von dem Asialorezeptor der Leber internalisiert werden (s. Abschnitt I.5.1.1). Die THCII-Komplexe besitzen hingegen eine wesentlich kürzere Halbwertszeit als freies HCII und werden vermutlich ebenso wie weitere Serpin-Enzym-Komplexe (α_1 -Proteinaseinhibitor, AT, α_1 -Antichymotrypsin) von einem gemeinsamen Leberzell-Rezeptor gebunden und internalisiert. Bei diesem Rezeptor scheint es sich um LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*) zu handeln (Kounnas *et al.* 1996), das vermutlich im Zusammenspiel mit weiteren membrangebundenen Faktoren (Cytokeratin 18, Heparansulfat-Proteoglykan) ternäre Vitronectin-Serpin-Enzym-Komplexe bindet und endozytiert (Wells *et al.* 1999). Heparansulfat-Proteoglykane binden dabei vermutlich den Serpin-Enzym-Komplex und präsentieren ihn dem LRP, der den Komplex daraufhin internalisiert (Wells *et al.* 1999). Darüber hinaus könnte die Heparin-Bindungsstelle von THCII-Komplexen für den nachfolgenden lysosomalen Abbau der Komplexe von Bedeutung sein: Bei einem anderen Serpin-Enzym-Komplex (Protease-Nexin-1-Urokinase) führt die spezifische Bindung des Komplexes an endosomales Heparin zur Anreicherung in Endosomen und zur Überführung in Lysosomen (Crisp *et al.* 2000).

Sogenannte SEC- (*serpin-enzyme-complex*)-Rezeptoren der Leber (Perlmutter *et al.* 1990, Joslin *et al.* 1993) konnten bislang nicht isoliert werden, so daß deren Existenz nur indirekt belegt ist. Endothelzellen internalisieren Vitronectin-TAT-Komplexe und transferieren sie in die subendotheliale Matrix (De Boer *et al.* 1995).

3.6 Rekombinante Expression

Für die rekombinante Expression von HCII wurden verschiedene pro- und eukaryotische Systeme verwendet (Tab. 3). Mit *E. coli* lassen sich lediglich Proteine ohne posttranslationale Modifikationen produzieren. Insektenzellen sind in der Lage, N-Glykosylierungen auszuführen, die jedoch im Vergleich zu Säugetier-N-Glykanen verkürzt und nicht sialyliert sind (Altmann *et al.* 1999). Daher weist HCII aus Insektenzellen im SDS-Gel eine reduzierte Molekularmasse auf (Ciaccia *et al.* 1995).

Die am häufigsten verwendeten Säugetierexpressionssysteme sind die Hamster-Zelllinien BHK (*baby hamster kidney*) und CHO (*chinese hamster ovary*), welche die meisten posttranslationalen Modifikationen von therapeutisch eingesetzten humanen Proteinen korrekt durchführen können. Sie erzeugen u. a. N-Glykane vom komplexen Typ mit endständigen, ausschließlich $\alpha(2\rightarrow3)$ -gebundenen Sialinsäuren. Den CHO- und BHK-Zellen fehlt jedoch eine

$\alpha(2\rightarrow6)$ -Sialyltransferase, die eine terminale $\alpha(2\rightarrow6)$ -Sialylierung vornimmt, wie sie humane Plasma-Proteine besitzen (Grabenhorst *et al.* 1999).

Tab. 3: Rekombinante Expression von humanem HCII und HCII-Mutanten.

Expressionssystem	Ref.
<i>E. coli</i> NM-522	Blinder <i>et al.</i> 1988
<i>E. coli</i> JM 101	Blinder <i>et al.</i> 1989, 1990 Derechin <i>et al.</i> 1990 Whinna <i>et al.</i> 1991 Van Deerlin & Tollefsen 1991
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Maekawa & Tollefsen 1996 Han <i>et al.</i> 1997 Han & Tollefsen 1998 Colwell <i>et al.</i> 1999
<i>E. coli</i> MV1184	Hayakawa <i>et al.</i> 1996, 2000 Hayashi <i>et al.</i> 1997
Retikulozyten-Lysat*	Sheffield <i>et al.</i> 1994 Sheffield & Blajchman 1995
Insekten-Zellen (Baculo-Virus)	Ciaccia <i>et al.</i> 1995, 1997a,b Bauman & Church 1999
COS-Zellen	Ragg <i>et al.</i> 1990a,b
BHK-Zellen (<i>baby hamster kidney cells</i>)	Liaw <i>et al.</i> 1999

* Kaninchen-HCII

4 Glykosaminoglykane, Proteoglykane und extrazelluläre Matrix

4.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) umgibt jede Zelle und umfaßt alle Strukturen des extrazellulären Raums eines Gewebes. Membranständige Proteine und Rezeptoren bilden die Verbindung zur Zelle und zum Zytoskelett. Die mechanischen Eigenschaften der ECM wird durch deren Komponenten bestimmt: Kollagene sind zugfest, Elastin ist elastisch und Kohlenhydratpolymere binden Ionen und Wasser und bilden so eine druckresistente gelartige Grundsubstanz (Alberts *et al.* 1994).

4.2 Struktur der Glykosaminoglykane

Die als Glykosaminoglykane (GAGs) bezeichneten Kohlenhydratpolymere sind unverzweigt und bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, wobei eines der Saccharid-Monomere immer ein Aminozucker ist und das zweite eine Uronsäure (Abb. 9a). Mit Ausnahme von Hyaluronsäure, die an der Plasmamembran synthetisiert wird, erfolgt die GAG-Synthese im Golgi-Apparat.

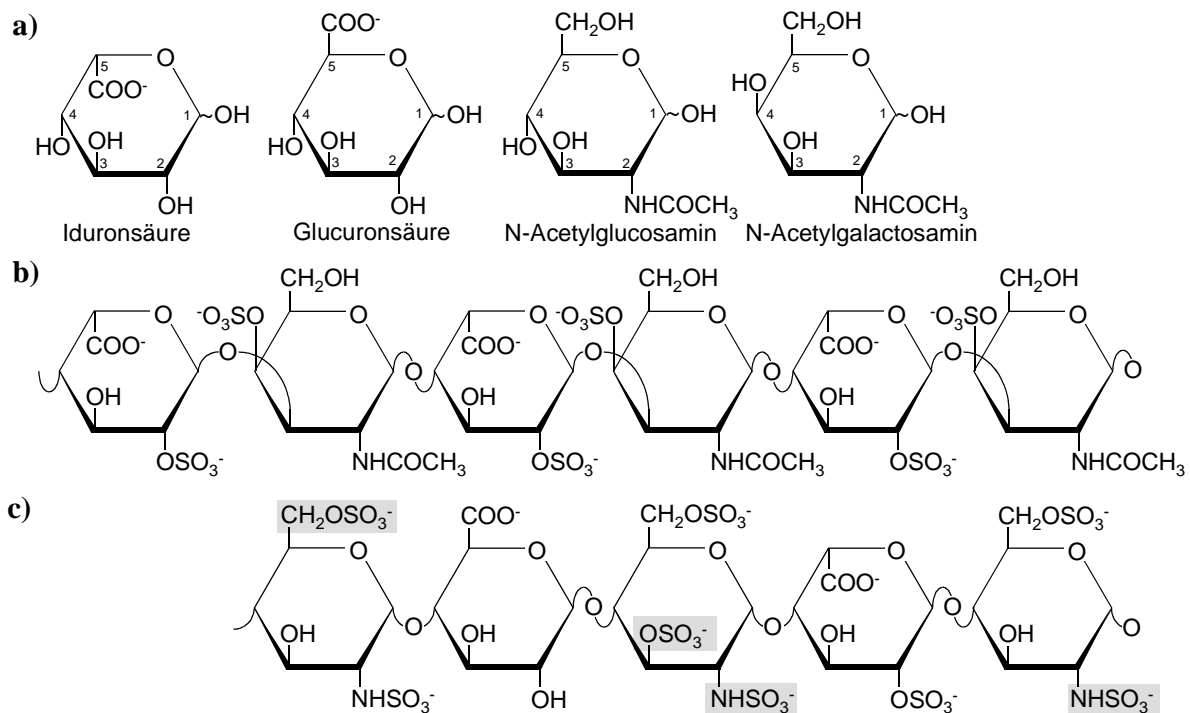


Abb. 9: a) Mono-Saccharid-Bausteine von Glykosaminoglykanen. Jeweils eine Uronsäure und ein Aminozucker bilden eine Disaccharideinheit, die zusammen mit der Verknüpfungsart (α oder β) und -position für einen bestimmten GAG-Typ charakteristisch ist. Die freien Hydroxyl- und die Aminogruppen können in unterschiedlichem Ausmaß sulfatiert sein.

Heparin: 1→4 verknüpfte Disaccharideinheiten aus einer β -Uronsäure (90% Iduronsäure und 10% Glucuronsäure, Position 2 evtl. sulfatiert) und einem α -Glucosamin (Aminogruppe und Position 3 und 6 überwiegend sulfatiert). MW: 5-40kD

Heparansulfat: Wie Heparin, aber überwiegend Glucuronsäure und insgesamt geringer sulfatiert. Manche Polymer-Abschnitte entsprechen jedoch vollständig der Heparin-Struktur.

Dermatansulfat (synonym: Chondroitinsulfat B): 1→4 verknüpfte Disaccharideinheiten aus einer β -Glucuron- oder Iduronsäure (Position 2 evtl. sulfatiert) und einem 1→3 verknüpften β -N-Acetylgalactosamin (Position 4 immer, Position 6 evtl. sulfatiert). MW: 15–40 kD

Chondroitinsulfat A und C: Wie Chondroitinsulfat B, aber Glucuronsäure statt Iduronsäure. Position 4 des N-Acetylgalactosamin ist bei Chondroitinsulfat A sulfatiert, Position 6 bei Chondroitinsulfat C. MW: 5-50 kD

Hyaluronsäure: 1→4 verknüpfte unsulfatierte Disaccharideinheiten aus einer β -Glucuronsäure und einem 1→3 verknüpften β -N-Acetylglucosamin. MW: 4–8.000 kD

Keratansulfat: 1→3 verknüpfte Disaccharideinheiten aus einer β -Galactose und einem 1→4 verknüpften β -N-Acetylglucosamin (Position 6 sulfatiert). MW: 4–19 kD

b) HCII-bindende Dermatansulfat-Hexasaccharidsequenz, enthalten zu ca. 2 % im DS-Polymer (Maimone & Tollefsen 1990)

c) AT-bindende Heparin-Pentasaccharidsequenz, enthalten zu ca. 4% in Heparin und <4 % in Heparansulfat. Die grau hinterlegten Sulfatierungen sind essentiell für die hochaffine AT-Bindung (Lindahl *et al.* 1984).

Die GAGs liegen meistens ihrerseits kovalent an *Core*-Proteine gebunden als Proteoglykane gebunden vor. Der Startpunkt der Synthese ist ein Tetrasaccharid (Glucuronsäure-Galactose-Galactose-Xylose) an einem Serin des Core-Proteins, an welches alternierend Glucuronsäure- und Aminozucker-Monosaccharide als UDP-Zucker anpolymerisiert werden (Lidholt 1997). Anschließend erfolgt in unterschiedlichen Ausmaß sowohl bei Heparin/Heparansulfat als auch bei Dermatansulfat eine C5-Epimerisierung der Glucuronsäure zu Iduronsäure. Weiterhin

wird bei Dermatan sulfat die Position 4 des N-Acetylglucosamins und in geringerem Umfang die Position 6 und die Position 2 der Iduronsäure sulfatiert (Linhardt & Hileman 1995). Heparansulfat besitzt eine typische Domänenstruktur, wobei einzelne Domänen der Heparin-Struktur entsprechen, welche die AT-bindende Pentasaccharid-Sequenz enthalten kann (Abb. 10). Der variable Umfang der Modifizierungsreaktionen resultiert in einer Mikroheterogenität der GAGs, deren funktionelle Bedeutung insbesondere bei Heparansulfat zunehmend bekannt wird (Lindahl *et al.* 1998, Tumova *et al.* 2000). Viele Proteine benötigen bestimmte Strukturmerkmale, um an Heparansulfat zu binden: FGF-2 bindet an 2-O-sulfatierte Iduronsäure, während PDGF (*platelet-derived growth factor*), *hepatocyte growth factor*, Lipoprotein-Lipase und gC-Glykoprotein von Herpes-simplex 6-O-sulfatierte Glucosamine zur Bindung benötigen (Lindahl *et al.* 1998). Die Struktur des Heparansulfats ist abhängig vom Gewebetyp und vom Entwicklungsstand des Organismus (Perrimon & Bernfield 2000) und wird u.a. durch extrazelluläre Signale beeinflusst.

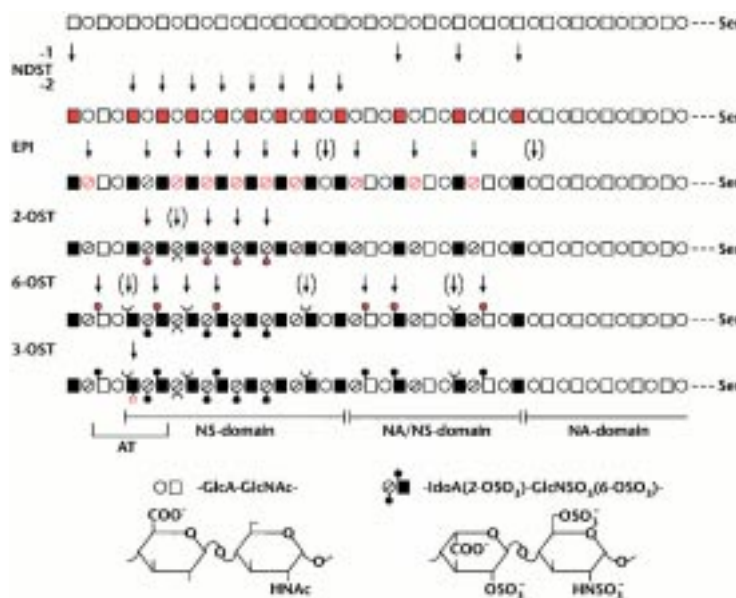


Abb. 10: Entstehung der typischen Domänenstruktur von Heparansulfat durch die sukzessive Modifikation des Glucuronsäure/N-Acetylglucosamin-Polymers durch verschiedene Enzyme. Die Pfeile geben die von den jeweiligen Enzymen modifizierten Reste (rot) an. Pfeile in Klammern weisen auf Modifikationen hin, die in variablem Umfang durchgeführt werden.

NS: N-sulfatiert, NA: N-acetyliert, AT: AT-bindende Pentasaccharid-Sequenz, die eine charakteristische 3-O-Sulfatierung trägt (offener Kreis). NDST: N-Deacetylase/N-Sulfotransferase; EPI: C5-Epimerase; 2-O-ST: Iduronsäure-2-O-Sulfotransferase; 6-O-ST: Glucosamin-6-O-Sulfotransferase; 3-O-ST: Glucosamin-3-O-Sulfotransferase; GlcA: Glucuronsäure; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; IdoA: Iduronsäure; GlcNSO₃: N-Sulfatylglucosamin. (entnommen aus Lindahl *et al.* 1998)

4.3 Proteoglykane

Proteoglykane lassen sich in drei Gruppen unterteilen, die bei Iozzo (1998) ausführlich beschrieben werden: Basalmembran-Proteoglykane, Hyalectane und kleine leucinreiche (*small leucine-rich*) Proteoglykane.

Je nach Bindegewebetyp dominieren bestimmte Proteoglykane und GAGs, die von den gewebetypischen Zellen synthetisiert werden. Durch einen Vorgang, der als *shedding* bezeichnet wird, können membrangebundene Proteoglykane von der Zelloberfläche abgestoßen werden (Bernfield *et al.* 1999). In Tabelle 4 sind dermatansulfathaltige Proteoglykane aufgeführt, die potentiell HCII, nicht aber AT aktivieren.

Tab. 4: Proteoglykane mit Dermatansulfat-Seitenketten (Iozzo 1998 und 1999)

Proteoglykan (Familie)	MW des core-Proteins [kD]	GAG-Typ*	GAG-Seitenketten pro Molekül	Vorkommen, Funktion
Versican (Hyalectan)	265-370	CS/DS	10-30	-verbindet Hyaluronan und Membran-Lektine (?)
Decorin (<i>small leucine rich, class I</i>)	40	DS/CS	1	-ECM von Haut, Sehnen, Bänder, Meniskus, Plazenta (Delorme <i>et al.</i> 1998) -auf Collagen-Fibrillen (Whinna <i>et al.</i> 1993) -bindet Collagen -Effekt in <i>knock-out</i> -Mäusen: brüchige Haut durch reduzierte Zugfestigkeit, lose unregelmäßige Collagen-Struktur (Danielson <i>et al.</i> 1997)
Biglycan (<i>small leucine rich, class I</i>)	40	DS/CS	2	-Regulator der Knochenbildung -bindet Collagen -Effekt in <i>knock-out</i> Mäusen: Osteoporose-Phänotyp, veränderte Knochenbildung und -struktur (Xu <i>et al.</i> 1998)
Epiphycan (<i>small leucine rich, class III</i>)	35	DS/CS	2-3	-bindet Collagen (?)

* CS: Chondroitinsulfat, DS: Dermatansulfat

4.3.1 Ortsabhängigkeit der HCII-Aktivierung durch Proteoglykane

Die Aktivierung von HCII setzt die Anwesenheit von Heparin, Heparansulfat oder Dermatansulfat voraus. Befindet sich in einer bestimmten Umgebung Heparin oder Heparansulfat, kann man von einer Thrombinhemmung hauptsächlich durch AT ausgehen, während beim Vorhandensein von Dermatansulfat Thrombin durch HCII gehemmt werden kann.

Heparin kommt nicht im Blutplasma vor, sondern ist Bestandteil der Granula von Mastzellen, wo es eine physiologische Funktion als Speicherhilfsstoff für basische Proteine (Histamin, Serotonin) hat. Erst nach Degranulation reguliert Heparin lokal die interstitielle Gerinnung und zahlreiche weitere Heparin-abhängige Vorgänge (Zehnder & Galli 1999).

Heparansulfat ist ein proteingebundenes Heparin-Äquivalent (s. Abschnitt I.4.2). Heparansulfat und Dermatansulfat liegen in proteingebundener Form als Proteoglykane vor, die ihrerseits überwiegend ortsgebunden an Zelloberflächen oder als Bestandteile der ECM vorkom-

men. Bei bestimmten Dermatansulfat-Proteoglykanen (Decorin, Biglykan), die häufig an Collagen gebunden vorliegen, konnte gezeigt werden, daß sie in der Lage sind, HCII zu aktivieren und so thromboresistente Oberflächen zu bilden (Whinna *et al.* 1993).

Hinsichtlich der Gewebeverteilung gibt es deutliche Unterschiede zwischen Heparansulfat und Dermatansulfat (Gomes & Dietrich 1982). Da sich HCII, anders als AT, auch durch Dermatansulfat aktivieren läßt, gibt dies einen Hinweis auf die bevorzugten Wirkungsorte von HCII und AT. Dermatansulfat-Proteoglykane befinden sich u. a. in der ECM von Arterienwänden, Haut, Knorpel und Knochen (Shirk *et al.* 1996)(s. auch Tab. 4).

Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) befinden sich hauptsächlich auf der luminalen und basalen Oberfläche von Endothelzellen (Cockwell *et al.* 1996), was die intravasale Thrombinhemmung durch AT erklärt.

Die Thrombin-Hemmung durch HCII wurde in Zellkulturen untersucht, wobei Endothelzellen keine HCII-Aktivierung hervorriefen, wohingegen Fibroblasten HCII aktivierten. Für diese unterschiedlichen Eigenschaften konnten Dermatansulfat-Proteoglykane identifiziert werden, die auf Fibroblasten vorkommen, nicht aber auf Endothelzellen (McGuire & Tollefsen 1987, Hiramoto & Cunningham 1988). Glatte Muskelzellen, die sowohl Dermatansulfat- als auch Heparansulfat-Proteoglykane enthalten, aktivieren HCII hauptsächlich durch Heparansulfat (Shirk *et al.* 1996).

Allerdings ist die GAG-Zusammensetzung der ECM dynamisch und hängt von zahlreichen Faktoren ab. Bei zunächst konfluenten Endothelzellen ändert sich das Heparansulfat/Dermatansulfat-Verhältnis während der Migration nach Endothelverletzung zugunsten von Dermatansulfat (Kinsella & Wight 1986) und wird durch Freisetzung von endogenem basischen FGF (*fibroblast growth factor*) vermittelt (Kinsella *et al.* 1997). Akut-Phase-Cytokine wie Interleukin 1 (IL1), Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF- α) aber auch Endotoxine und neutrophile Granulozyten bewirken eine Verringerung zellgebundener Dermatansulfat- und Heparansulfat-Proteoglykane durch Abstoßung (Klein *et al.* 1992), was den Verlust von GAGs in entzündeten Geweben erklärt (Murch *et al.* 1993). IFN- γ verursacht eine Zunahme von zellgebundenen Dermatansulfat-Proteoglykanen auf Endothelzellen und Fibroblasten (Klein *et al.* 1992, Praillet *et al.* 1996).

Ein Beispiel für die ortsspezifische Wirkung von HCII ist die Plazenta, in der im Verlauf einer Schwangerschaft aufgrund reichlich vorhandenen Gewebefaktors (siehe extravaskuläres System, Abb.7) vermehrt Prothrombin aktiviert wird. Dieses Thrombin wird besonders durch HCII inaktiviert, da die Plazenta hohe Konzentrationen eines Dermatansulfat-Proteoglykan (Decorin) erzeugt. Dieses liegt sowohl in der ECM gebunden vor, wird aber auch in löslicher Form ins Plasma abgegeben (Delorme *et al.* 1998).

Die Gegenwart von Dermatansulfat-Proteoglykanen und – in geringerem Ausmaß – Heparansulfat-Proteoglykanen scheint eine notwendige Voraussetzung für die ortsspezifische HCII-vermittelte Thrombin-Inhibition zu sein. Die Fähigkeit HCII zu aktivieren hängt allerdings zusätzlich von der GAG-Struktur (z. B. Sulfatierungsgrad) und der Zugänglichkeit ihrer Bindungsstellen ab. Letzteres wird in erheblichem Umfang durch die Anwesenheit weiterer

GAG-bindender Proteine beeinflusst (Tollefsen & Pestka 1985), welche mit HCII um die Bindungsstellen konkurrieren. Dermatansulfatbindende Proteine im Blutplasma sind z. B. histidinreiches Glykoprotein, Apolipoprotein E, Fibrinogen und Vitronectin (Zammit & Dawes 1995). Für histidinreiches Glykoprotein (Tollefsen & Pestka 1985) und Vitronectin (Preissner & Sie 1988, Petzelbauer *et al.* 1992) konnte jedoch gezeigt werden, daß sie keinen dämpfenden Einfluß auf die Dermatansulfat-katalysierte Thrombininhibition durch HCII haben.

4.4 Wechselwirkung zwischen Glykosaminoglykanen und Proteinen

Glykosaminoglykane (GAGs) sind unverzweigte Polyanionen, die wegen ihrer negativen Ladungen bevorzugt an basische Domänen von Proteinen binden.

Diese Bindung kann sequenzspezifisch wie bei der Bindung eines definierten Heparin-Pentasaccharids (Abb. 9c) an AT sein, wobei nicht jedes Heparin-Molekül diese Sequenz enthält (Oscarsson *et al.* 1989). Auch für HCII konnte eine hochaffine Dermatansulfat-Struktur identifiziert werden, die aus einer Sequenz von drei identischen Disaccharid-Einheiten besteht (Maimone & Tollefsen, 1990)(s. Abb. 9b).

Im Gegensatz zur AT-Heparin-Bindung wird jedoch für die HCII-Bindung an GAGs eine etwas unspezifischere Wechselwirkung angenommen, da eher die Ladungsdichte als die Position der geladenen Gruppen des Heparins (Petitou *et al.* 1988) oder Dermatansulfats (Sinniger *et al.* 1993) die Affinität beeinflusst. GAGs binden mit höherer Affinität an Arginin- als an Lysin-Reste, weshalb erstere häufiger in Bindungsstellen anzutreffen sind (Fromm *et al.* 1995). Neben den Ladungen der GAGs können auch nichtionische Wechselwirkungen zur Gesamtbindungsenergie beitragen, wie die Heparin-AT-Bindung mit einem Anteil von 60 % nichtionischer Bindungsenergie zeigt (Desai *et al.* 1998, Olson *et al.* 1992).

Ähnlich wie bei der Nukleinsäure-Protein-Bindung trägt auch bei der GAG-Protein-Bindung eine Entropiezunahme (Polyelektrolyteffekt) wesentlich zur Bindungsenergie bei, da infolge der Proteinbindung an die GAGs gebundene Kationen (z.B. Na⁺) freigesetzt werden (s. Abschn. 4.4.1). Für die GAG-Bindung an AT konnte ein *induced-fit*-Mechanismus identifiziert werden. Die Bindung des Heparins erfolgt dabei zunächst unvollständig, induziert jedoch eine Konformationsänderung der Bindungsstelle, die daraufhin eine vollständige und hochaffine Bindung ermöglicht (Desai *et al.* 1998). Andere Proteine wie bFGF (*basic fibroblast growth factor*) ändern ihre Konformation durch die Heparinbindung nicht (Faham *et al.* 1996).

4.4.1 Einfluß der NaCl-Konzentration auf die Protein-Heparin-Wechselwirkung

Die thermodynamische Theorie der Bindung eines Liganden an Polyelektrolyte wurde von Record *et al.* (1976) für die Protein-DNA-Wechselwirkung entwickelt und läßt sich auf die Bindung von Proteinen an GAGs wie Heparin anwenden (Olson *et al.* 1991, Hileman *et al.* 1998): Die treibende Kraft der Protein-Heparin-Bindung bei physiologischer Ionenstärke ist demnach die Entropie erhöhende Freisetzung von Kationen aus dem polyanionischem Heparin.

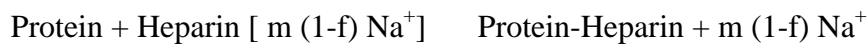
rin in Folge der Bindung an das Protein. Dieser sogenannte Polyelektrolyteffekt hat einen maßgeblichen Anteil an der freien Bindungsenthalpie ΔG .

Die Affinität („Klebrigkeit“) der Bindung eines Proteins (P) an Heparin (H) wird durch die Dissoziationskonstante K_D beschrieben, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt:

$$K_D = \frac{[P][H]}{[PH]} \quad (1)$$

Eine kleine Dissoziationskonstante zeigt dabei an, daß das Bindungsgleichgewicht auf der Seite des Komplexes (PH) liegt.

Bindet ein Protein an Heparin (oder andere Polyanionen), werden jedoch Kationen (z. B. Na^+) von Heparin freigesetzt:



wobei m die Anzahl der ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Protein und Heparin ist, und f den Anteil der anionischen Reste von Heparin darstellt, deren Ladung im freien Molekül nicht durch Na^+ neutralisiert vorliegt.

Die Dissoziationskonstante der Gesamtreaktion $K_{D, \text{gesamt}}$ läßt sich daher wie folgt beschreiben:

$$K_{D, \text{gesamt}} = \frac{[P^{m+}][H]}{[PH][\text{Na}^+]^{m(1-f)}} = K_D / [\text{Na}^+]^{m(1-f)} \quad (2)$$

Durch Logarithmieren und Umstellen ergibt sich daraus der Zusammenhang zwischen der Dissoziationskonstante des Protein-Heparin-Komplexes K_D und der Na^+ -Konzentration:

$$\log K_D = \log K_{D, \text{gesamt}} + m(1-f) \log [\text{Na}^+] \quad (3)$$

Mit zunehmender Na^+ -Konzentration steigt demnach auch K_D , was eine sinkende Affinität des Proteins zu Heparin anzeigt. Daher ist die NaCl -Konzentration, bei der eine Elution des Proteins von Heparin erfolgt, ein indirektes Maß für die Affinität. Dabei wird die Annahme gemacht, daß die Parameter $K_{D, \text{gesamt}}$, m und f in dem untersuchten NaCl -Konzentrationsbereich konstant sind.

In Gegenwart einer hohen Na^+ -Konzentration (1 M Na^+) erfolgt kaum noch eine Freisetzung des Na^+ vom Heparin, so daß die Protein-Heparin-Wechselwirkung dann hauptsächlich einen nichtionischen Charakter hat. Bei einer Na^+ -Konzentration von 1 M ist K_D gleich $K_{D, \text{gesamt}}$. $K_{D, \text{gesamt}}$ stellt damit ein Maß für den nichtionischen Anteil der Bindungsenergie dar.

5 Posttranslationale Modifikationen von Proteinen

Proteine entstehen während des Translationsprozesses zunächst als Polypeptidkette, die sich im wässrigen Milieu der Zelle aufgrund ihrer partiell hydrophoben Eigenschaft zu falten beginnt. Schon während der Translation (kotrational) kann es zu ersten biochemischen Modifikationen bestimmter Aminosäuren kommen, wie im Falle der N-Glykosylierungen (s. Abschnitt I.5.1). Weitere posttranslationale Modifikationen können danach erst am vollständig gefalteten Protein vorgenommen werden. Posttranslationale Modifikationen sind allenfalls indirekt auf der DNA-Ebene determiniert, tragen jedoch entscheidend zur biologischen Funktion bei. Von über 150 bekannten posttranslationalen Modifikationen sind Phosphorylierung, Sulfatierung, Acetylierung, Methylierung sowie die Verknüpfung bestimmter Aminosäuren mit Lipiden oder Glykanen die häufigsten. Posttranslationale Modifikationen führen zu Ladungs-, Konformations- und Massenänderungen und beeinflussen daher u. U. das elektrophoretische Laufverhalten. Befinden sich an einem Asparagin unterschiedliche Kohlenhydratseitenketten, spricht man von Mikroheterogenität.

Da HCII ein Glykoprotein mit 2 Tyrosin-Sulfatierungen ist, wird hier lediglich auf Protein-Glykosylierungen und Tyrosin-Sulfatierungen eingegangen. Weitere posttranslationale Modifikationen von HCII sind jedoch nicht ausgeschlossen.

5.1 Glykosylierung von Proteinen

Die Glykosylierungen von Proteinen sind entweder N-gebunden an den terminalen Stickstoff von Asparagin, oder O-gebunden an den terminalen Sauerstoff von Serin oder Threonin. Die Biosynthesewege dieser N- und O-gebundenen Glykane unterscheiden sich grundlegend. Während die O-Glykansynthese posttranslational sukzessiv in Monosaccharid-Schritten abläuft, was eine erhebliche Variabilität zur Folge hat, beginnt die N-Glykansynthese bereits kotrational und beinhaltet eine gemeinsame Kernstruktur. Dabei wird zunächst im endoplasmatischen Retikulum (ER) lumenseitig ein mannosereiches Polysaccharid-Modul von einem Membrananker (Dolicholphosphat) auf das Asparagin einer Erkennungssequenz der naszierenden Polypeptidkette übertragen. In der Konsensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr, die sich bevorzugt in Schleifenregionen befindet, darf X jede Aminosäure außer Prolin und Aspartat sein (Lottspeich & Zorbas 1998). Allerdings werden nicht alle potentiellen Bindungsstellen besetzt, da u.a. die Wahrscheinlichkeit der N-Glykosylierung im Verlauf der Polypeptidkettenverlängerung aus sterischen Gründen sinkt. Die folgende Prozessierung beginnt mit dem Stutzen des mannosereichen Vorläufermoduls im ER und im Golgi-Apparat durch Glucosidasen und Mannosidasen. Im Golgi-Apparat erfolgt dann eine Kettenverlängerung durch spezifische Glykosyltransferasen (Alberts *et al.* 1994).

Die Polypeptiddomäne (8 bis 15 Aminosäure-Reste) im Bereich des glykosylierten Asparagins hat dabei Einfluß auf die Glykanstruktur (Grabenhorst *et al.* 1999). Die fertigen N-Glykane variieren zwar beträchtlich, lassen sich jedoch in drei Typen unterteilen (Abb. 11a). Alle Typen haben ein invariantes Pentasaccharid gemeinsam, das unterschiedlich viele Fort-

sätze (Antennen) tragen kann. Glykoproteine sind häufig mikroheterogen, da sie fast immer aus einer Mischung verschiedener Glykoformen bestehen, die sich in Anzahl, Lokalisation und Sequenz der Glykane unterscheiden.

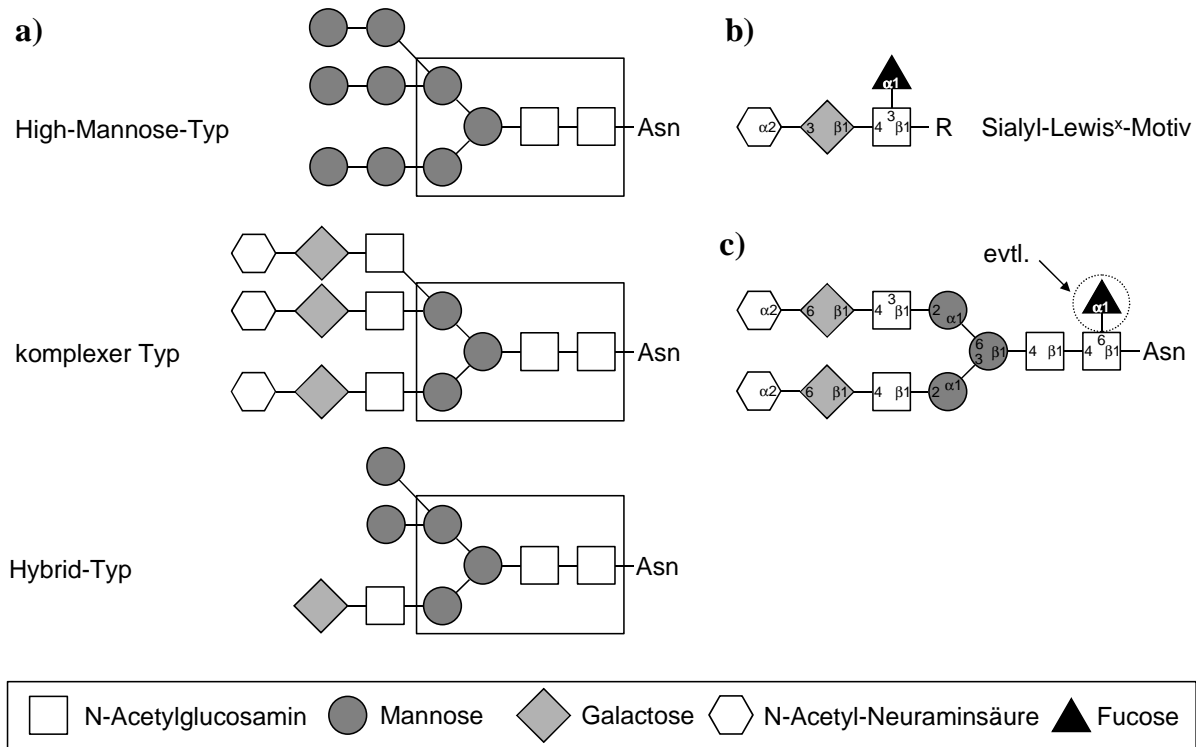


Abb. 11: N-Glykosylierungen von Proteinen.

a) Beispiele für die drei Grundtypen der N-Glykane. Allen N-Glykanen ist ein Pentasaccharid gemeinsam (Kasten), das N-glykosidisch mit Asparagin verknüpft ist. An die beiden α -Mannose-Reste des Pentasaccharids sind weitere Zucker gebunden, deren Art den Grundtyp bestimmt und deren Anzahl die Zahl der Antennen.

b) Sialyl-Lewis^x-Motiv, das sowohl bei O- als auch bei N-Glykanen (z.B. vom komplexen Typ) auftreten kann. R: Kohlenhydratrest; **c)** biantennäres komplexes N-Glykan, das typisch für viele Plasmaproteine (z. B. AT) ist. Die endständige Sialylierung (N-Acetyl-Neuraminsäure) ist oft nicht vollständig und das proximale N-Acetylglucosamin kann fucosyliert sein. Auch $\alpha(2\rightarrow3)$ -gebundene Sialinsäuren kommen vor und ergeben in Verbindung mit einer peripheren Fucosylierung ein Sialyl-Lewis^x-Motiv.

Die Funktionen der Zuckermodifikationen von Proteinen (und auch Lipiden) sind wahrscheinlich ebenso vielfältig wie die zugrunde liegenden Strukturvarianten. Die Glykosylierung eines Glykoproteins hängt von dessen Proteinstruktur sowie der Umgebung (Spezies, Gewebetyp, Zelltyp) ab und wird zusätzlich vom physiologischen Zustand (z. B. Gesundheit) des Organismus beeinflusst. Einen Überblick über die Funktionen von Glykosylierungen geben Review-Artikel (Varki 1993, Reuter & Gabius 1999).

Als Reaktion auf Entzündungsprozesse werden von der Leber vermehrt Akute-Phase-Proteine produziert, die je nach Entzündungsphase unterschiedliche Glykosylierungsvarianten tragen. Bei einigen dieser Proteine findet man dann zusätzliche Sialyl-Lewis^x-Strukturen (α_1 -saures Glykoprotein, α_1 -Antichymotrypsin, Haptoglobin), die u.a. dafür bekannt sind, an Selectine

zu binden (Brinkman-van der Linden *et al.* 1998). Letztere vermitteln die Leukozyten-Adhäsion (*rolling*) z. B. an Endothelzellen (Lasky 1992).

5.1.1 Bedeutung der Glykosylierung am Beispiel Antithrombin

Antithrombin (AT) besitzt vier N-Glykane vom biantennären komplexen Typ (Franzen & Svensson 1980)(Abb.11c). Diese vollständig glykosylierte Form wird als AT- α bezeichnet, während AT- β aufgrund eines fehlenden N-Glykans am Asparagin 135 erheblich fester an Heparin bindet. Die β -Form macht zwar nur 10 % des ATs im Plasma aus, stellt jedoch vermutlich in verletzten und intakten Blutgefäßen die aktivere Isoform wegen der hohen Affinität zu Heparansulfat-Proteoglykanen dar (Witmer & Hatton 1991). Weitere Glykosylierungsvarianten beeinflussen die Heparin-Affinität (Brennan *et al.* 1987, Björk *et al.* 1992, Garonne *et al.* 1996) und damit die Heparin-katalysierte Thrombinhemmung.

Die endständigen Sialinsäuren der N-Glykane maskieren die dahinter liegenden Galactose-Reste, welche von Asialoglykoprotein-Rezeptoren (Weiss & Ashwell 1989) in der Leber erkannt werden und am Clearing von AT beteiligt sind. Daher hat der Sialylierungsstatus Einfluß auf die Verweilzeit (Halbwertszeit) von AT im Blutkreislauf (Zettlmeissl *et al.* 1989). Auch die Gesamtzahl der N-Glykane beeinflußt die Halbwertszeit (Ni *et al.* 2000).

Rekombinantes AT aus CHO-Zellen weist im Vergleich zu Plasma-AT Unterschiede im Glykosylierungsmuster auf. Die endständigen Sialinsäuren sind nicht $\alpha(2\rightarrow6)$ -gebunden, sondern ausschließlich $\alpha(2\rightarrow3)$ -verknüpft und das proximale N-Acetylglucosamin (GlucNAc) ist überwiegend fucosyliert. Außerdem besitzt rekombinantes CHO-AT neben di- auch tri- und tetraantennäre Strukturen. Die Pharmakokinetik wird durch diese Unterschiede jedoch nur geringfügig beeinflußt (Zettlmeissl *et al.* 1989). Eine Expression von aktivem AT in *E. coli* gelingt nicht, da möglicherweise die fehlenden Chaperone und Disulfidisomerasen oder auch fehlende N-Glykosylierungen eine korrekte Proteinfaltung verhindern (Olson *et al.* 1997, Bock *et al.* 1982). Allerdings wurde ebenfalls N-glykanfreies AT zellfrei in Reticulocytensatz exprimiert, das zwar teilweise aktiv war (es bildete Thrombin-Komplexe), aber eine deutlich geringere und inhomogene Heparin-Affinität zeigte (Austin *et al.* 1990).

5.2 Tyrosin-Sulfatierung von Proteinen

Die Tyrosin-Sulfatierung ist eine weitverbreitete posttranslationale Modifikation von Proteinen (Beisswanger *et al.* 1998) in allen Geweben höherer Lebewesen (Metazoa). Die Tyrosin-Sulfatierung erfolgt durch die Tyrosylproteinsulfotransferase, einem zum Lumen gerichteten Membranprotein des *trans*-Golgi-Netzwerks, und stellt damit einen der letzten Schritte der Biosynthese dar. Der Sulfatrest wird dabei von PAPS (3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat) auf die Hydroxylgruppe von Tyrosin übertragen, das von einer Konsensus-Sequenz umgeben ist.

Meist befindet sich in aminoterminaler Nachbarschaft (-1 Position) eine saure Aminosäure (Asp oder Glu) und mindestens zwei bis drei weitere zwischen den Positionen -5 bis +5, aber nur wenige basische und hydrophobe Aminosäuren (Huttner 1987). Auch HCII entspricht diesem Konsensus-Signal in der Umgebung von Tyrosin 60 und 73 (Abb. 4). Entsprechend ihres Syntheseortes (Golgi-Apparat) sind Tyrosin-sulfatierte Proteine membranständig oder sekretorisch. Als physiologische Funktion ist eine verstärkende Wirkung auf Protein-Protein-Wechselwirkungen beschrieben bei der Leukozyten-Adhäsion, Hämostase und Chemokin-Signalen (Tab. 5) (Kehoe & Bertozzi 2000).

Bei P-Selektin-Glykoproteinligand-1 (PSGL-1) wird die Bindung an P-Selectin durch eine Zuckerstruktur (Sialyl-Lewis^X-Motiv) in Verbindung mit einer Tyrosin-Sulfatierung vermittelt. PSGL-1 ist ein auf Leukozyten lokalisiertes Membranprotein, das in Verbindung mit den P- und E-Selectinen der Endothelzellen das *rolling* der Leukozyten auf der Gefäßwand bei Endzündungsprozessen ermöglicht (Sako *et al.* 1995, Li *et al.* 1996).

Tab. 5: Beispiele verstärkter Protein-Protein-Wechselwirkung durch Tyrosin-Sulfatierungen

Tyr-sulfatiertes Protein	Bindungspartner	Ref.
PSGL -1	P-Selektin	Sako <i>et al.</i> 1995
Hirudin	Thrombin	Chang 1983
Komplement-C4	Komplement-C1s	Hortin <i>et al.</i> 1989
Faktor VIII	von Willebrand Faktor	Leyte <i>et al.</i> 1991
Fibronectin	Fibrin	Suiko & Liu 1988

6 Zielsetzung der Arbeit

HCII besitzt für die Glykosaminoglykane (GAGs) Heparin und Dermatansulfat eine basische Bindungsstelle, an die jedoch intramolekular auch eine saure Domäne des N-Terminus bindet. Heparin und Dermatansulfat beschleunigen die Inhibition von Thrombin, indem sie durch die Bindung an HCII den N-Terminus freisetzen, der spezifisch an Thrombin bindet. Trotz der hohen Spezifität für Thrombin ist die physiologische Aufgabe von HCII unklar, da Thrombin in der Blutzirkulation hauptsächlich durch Antithrombin gehemmt wird.

Der Nachweis der HCII-bindenden GAGs Heparin/Heparansulfat und Dermatansulfat in der extrazellulären Matrix (ECM) kann Aufschluß über potentielle Wirkungsorte von HCII in Geweben geben. Dazu sollte ein Immunfluoreszenz-Nachweis-Verfahren für HCII in der ECM entwickelt werden.

Die Eigenschaft von HCII an Heparin und Dermatansulfat zu binden, ist nicht nur Voraussetzung für die effiziente Thrombin-Inhibition, sondern kann darüber hinaus bei Clearing-Prozessen eine Rolle spielen. Weiterhin gibt es wenig Information über die Wechselwirkung des Thrombin-HCII-Komplexes mit diesen GAGs. Daher sollte die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen HCII sowie seinen Komplexen mit Thrombin und Heparin einen Schwerpunkt dieser Arbeit bilden. Von besonderem Interesse ist dabei die Frage, ob die N-Glykane von HCII die Heparin-Bindung beeinflussen, wie dies bereits bei Antithrombin gezeigt werden konnte (vgl. Abschn. I.5.1.1)

Durch die Aufreinigung von humanem HCII aus Plasma sowie die Etablierung einer stabil HCII-exprimierende CHO-Zelllinie sollte ausreichend Untersuchungsmaterial hergestellt werden. Die CHO-HCII-Zelllinie ermöglicht weiterhin eine Unterdrückung von posttranslationalen Modifikationen, so daß deren Einfluß auf das Heparin-Bindungsverhalten untersucht werden kann. Dazu sollte mit Hilfe der Inhibitoren Tunicamycin und Chlorat die N-Glykosylierung bzw. die Tyrosin-Sulfatierung von HCII gezielt metabolisch gehemmt werden.

Um einen Bezug zwischen Struktur und Funktion der posttranslationalen Modifikationen herzustellen, sollte in Kooperation mit einer anderen Arbeitsgruppe die bisher unbekannt Struktur der N-Glykane aufgeklärt werden.

II Material und Methoden

Die Herkunft der verwendeten Chemikalien ist im Anhang angegeben. Es fand ausschließlich Reinstwasser Verwendung, das mit einer Milli-Q-Anlage (Millipore) hergestellt wurde.

1 Zellkultur

Als Zellkultur wird die *in-vitro*-Kultivierung von Zellen tierischer und pflanzlicher Herkunft – also höheren Eukaryoten – bezeichnet, und damit begrifflich von den mikrobiellen Kultur-Methoden (Bakterien, Pilze) abgegrenzt. Die Zellkultur stellt höhere Anforderungen an die Steriltechnik. Die verwendeten Nährmedien sind auch ideale Nährböden für viele kontaminierende (mikrobielle) Organismen, die wegen ihrer höheren Wachstumsraten eine Zellkultur schnell überwachsen können. Für alle Zellkulturarbeiten wurde steriles Material benutzt und in partikelfreier Umgebung (Sterilwerkbank) gearbeitet. Arbeiten mit rekombinanten Organismen, die ausnahmslos der Sicherheitsstufe 1 zugehörten, wurden entsprechend der gesetzlichen Auflagen (nach Gentechnikgesetz) durchgeführt.

1.1 Medien

Ein geeignetes Nährmedium für tierische Zellen ist aufgrund ihrer Herkunft grundsätzlich das entsprechende Blutserum. Dieses enthält naturgemäß alle für das Wachstum benötigten Nährstoffe, Wachstums- und Anheftungsfaktoren. Solche Seren sind allerdings oft schwer verfügbar oder relativ teuer und in der Zusammensetzung nicht definiert. In der Zellkultur werden deshalb vollsynthetische Nährmedien (Barnes & Sato 1980) eingesetzt, die bei Bedarf mit Serum oder Wachstumsfaktoren angereichert das Wachstum der Zellen gewährleisten. Als Serumzusatz für die meisten Zelltypen hat sich fötales Kälberserum (FCS) bewährt, das viele Wachstumsfaktoren, aber wenig evtl. störende Antikörper (Lindl & Bauer 1994) enthält.

Die verwendeten Medien wurden als Pulvermedien mit Milli-Q-Reinstwasser angesetzt und nach Zugabe aller Supplemente mit einem 0,2 µm Sterilfilter (Sartolab P, Sartorius) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe sterilfiltriert. Nachträglich zugegebene Supplemente wurden mit einem Spritzenvorsatz-Sterilfilter (Minisart 0,2 µm, Sartorius) sterilfiltriert. Die Medien-Zusammensetzung ist bei den jeweiligen Zelllinien in Abschnitt II.1.2 aufgeführt. Alle Medien enthielten zur Vermeidung mikrobiellen Wachstums einen Penicillin- und Streptomycin-Zusatz. Da durch diese Antibiotika eine latente Kontamination unerkannt bleiben kann, wurden die Kulturen regelmäßig zur Kontrolle auch antibiotikafrei kultiviert.

Folgende Basal-Medien kamen zum Einsatz:

- Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, DMEM, (31600, Gibco/Life Technologies)
- DMEM/F12 (32500, Gibco/Life Technologies)

- Ham's F12 (21700, Gibco/Life Technologies)
- MEM Alpha Medium ohne Nukleoside (12000, Gibco/Life Technologies)
- DMEM/F12 ohne Gln, Leu, Lys, Met, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, NaHCO₃ und Phenolrot (D9785, Sigma)

Den Basalmedien wurden je nach Verwendungszweck folgende Supplemente in den angegebenen Konzentrationen zugegeben:

- Fötales Kälberserum (FCS): (10106-169, Gibco/Life Technologies).
Die Konzentration ist bei den jeweiligen Medien angegeben.
- Aminosäuren in der jeweils angegebenen Konzentration.

100x Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (Pen./Strep.): 0,63 g Penicillin G (P-3032, Sigma) und 1,0 g Streptomycin (722K779117, Merck) in 100 ml H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Penicillin G und Streptomycin zerfallen in Lösung bei 37 °C bereits nach 3 Tagen, so daß für einen wirkungsvollen Einsatz entsprechend häufig das Medium gewechselt wird. Pro Liter Medium werden 10 ml der Stammlösung zugegeben.

Serumalbumin (67 kD) hat neben seiner Aufgabe als Massenprotein (ca. 40 g/l) im Blutplasma einen kolloidosmotischen Druck aufrechtzuerhalten auch eine Transportfunktion u.a. für Fettsäuren und Lipide (He & Carter 1992) und ist daher auch als Schutzprotein zu verstehen, da z.B. freie Fettsäuren für tierische Zellen toxisch sind. Als relativ preiswertes Protein wird es serumfreiem Medium zugegeben, um von den Zellen sezernierte Proteine vor proteolytischem Abbau zu schützen. Bovines Serumalbumin (BSA, Fraction V, standard grade, Serva) wurde in der jeweils angegebenen Konzentration im Medium gelöst und dieses danach sterilfiltriert.

Insulin (5,7 kD) hat einen positiven Einfluß auf die Proteinsynthese und Zellproliferation durch seine stimulierende Wirkung auf die Glukoseaufnahme, die Fettsäuresynthese und den Kohlenhydratstoffwechsel (Jäger *et al.* 1988). Stammlösung: 1 g Rinderinsulin (Sigma) in 100 ml H₂O gelöst. Mit 1 M HCl auf pH 2,5 einstellen und sterilfiltrieren. Konzentration im Medium: 10 mg/l

Transferrin (85 kD) dient als Eisentransportprotein, das als Holotransferrin zwei Fe³⁺ bindet und durch rezeptorvermittelte Endozytose von den Zellen aufgenommen wird. Als eisenfreies Apotransferrin wird es wieder ins Medium abgegeben (Alberts *et al.* 1994). Transferrin wird meistens zusammen mit Insulin in serumfreien Medien eingesetzt (Barnes & Sato 1980). Eisengesättigte sterile Human-Transferrin-Stammlösung (82-349-1, Bayer) wurde entsprechend einer Endkonzentration von 10 mg/l zugegeben.

1.2 Zelllinien

Für die Herstellung von HCII kamen CHO-Zellen zum Einsatz, die mit der cDNA von humanem HCII transfiziert wurden, sowie die humane Leberzelllinie HepG2. Für die HCII-Bindungs-Versuche an extrazelluläre Matrix fanden Endothelzellen (BAEC), Lungenmyofibroblasten (IMR-90), und Lungenepithelzellen (A549) Verwendung. Die BAEC- und IMR-90-Zellen zeichneten sich durch eine begrenzte Teilungsfähigkeit aus, im Gegensatz zu den transformierten und daher kontinuierlich wachsenden Zelllinien (CHO, A549, HepG2).

1.2.1 Herstellung der rekombinanten Zelllinie CHO_{HCII}

CHO_{HCII}-Zellen sind *chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen, die mit der cDNA von humanem HCII transfiziert wurden.

Für eine stabile Expression von Proteinen mit säugetiertypischem Glykosylierungsmuster eignen sich CHO-Zellen in besonderem Maße (Grabenhorst *et al.* 1999). Diese Zellen können im großen Maßstab kultiviert werden, integrieren transfizierte Gene stabil in ihr Genom, und können so, oft auch ohne permanenten Selektionsdruck (MTX, s. u.), das Zielgen hoch exprimieren.

Zur Herstellung hochexprimierender rekombinanter CHO-Zelllinien wird die Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Methode angewandt. Dabei wird das Zielgen zusammen mit der DHFR-cDNA (Subramani *et al.* 1981) in DHFR-defiziente CHO-Zellen transfiziert, und ermöglicht so deren Koselektion und Koamplifikation (Urlaub & Chasin 1980; Ringold *et al.* 1981; Kaufman & Sharp 1982). Dihydrofolatreduktase katalysiert die Bildung von Tetrahydrofolat, welches zur Synthese von Purinen, Aminosäuren und Nukleotiden benötigt wird. Mit Hilfe von Methotrexat (MTX), einem spezifischen DHFR-Inhibitor, können Zellen selektiert werden, die eine erhöhte Anzahl von Kopien des DHFR-Gens enthalten. Da Duplikationen des DHFR-Gens spontan auftreten, können über eine sukzessive Erhöhung der MTX-Konzentration im Medium Zellen selektioniert werden, die durch Amplifikation bis zu 1000 Gen-Kopien besitzen. Auch die direkte Umgebung des DHFR-Gens wird meist mit amplifiziert, so daß auch ein nicht selektierbares Gen koamplifiziert werden kann. Selektierbares und nichtselektierbares Gen können gleichzeitig auf verschiedenen Vektoren transfiziert werden, da meistens beide Vektoren an der gleichen Stelle ins Wirtsgenom inserieren (Schimke 1984). Zum Einschleusen der Fremd-DNA in die Zelle gibt es neben Methoden mit „nackter“ DNA wie Mikroinjektion oder Elektroporation, zahlreiche Verfahren, die auf der Komplexbildung des Polyanions DNA an meist positiv geladene Carrier beruhen: Calciumphosphat-Kopräzipitation, DEAE-Dextran- oder Polybren-Polykationen, Lipofektion und Mikroprojekte (Keown *et al.* 1990). Zur stabilen Expression in CHO-Zellen hat sich neben der Calciumphosphat-Kopräzipitation die Polybren-vermittelte Transfektion (Chaney *et al.* 1986) bewährt.

<u>Material für die HCII-CHO-Transfektion</u>	
Zelle:	CHO DUKX B1 (ATCC Nr. CRL 9010)
Plasmide:	pSV2dhfr (Subramani <i>et al.</i> , 1981) pWTBI2 (H. Ragg): <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI gespaltenes pSV2-Derivat mit einligierter HCII-cDNA (inklusive Signal-Peptid, <i>Hind</i> III-Schnittstelle am 5'-Ende bis <i>Eco</i> RI-Schnittstelle in Position 1559 in der 3'-untranslatierten Region), die vom SV40 Promotor und dem Polyadenylierungs-Signal flankiert wird (Numerierung nach Ragg 1986)
Polybren:	Hexadimethrin-Bromid: 1,5-Dimethyl-1,5-Diazaundecamethylen Polymethobromid (H9268; Sigma)
Selektionsmedium:	MEM Alpha Medium ohne Nukleoside (12000-063, Gibco/Life Technologies), 3 mM Gln, 0,3 mM Prolin, Pen./Strep., MTX, 10% dialysiertes Serum: NCS (Flow) bzw. FCS (Gibco/Life Technologies), 5 d bei 4 °C gegen PBS dialysiert mit Dialysemembran 12-14 kD MWCO (Medicell)

Die CHO_{HCII}-Zelllinie wurde in der *AG Zelluläre Genetik* hergestellt. Die Transfektion mit Polybren (Chaney *et al.* 1986) führte H. Ragg durch, während die Amplifikation mit verschiedenen MTX-Konzentrationen A. Strathmann vornahm.

Die DNA-Lösung, welche die Plasmide im Massen-Verhältnis 1:5 (2 µg pSV2dhfr, 10 µg pWTBI2) enthielt, wurde mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 versetzt, um anschließend mit 2 Vol. (bezogen auf die wässrige DNA/Na-Acetat-Lösung) Ethanol bei -20 °C gefällt und zentrifugiert (5 min, 10.000 x g) zu werden.

Durch Lösen in Ham's F12 ergab sich nach einem weiteren Waschschriff mit 70 % Ethanol und anschließendem Trocknen eine Plasmid-Stammlösung mit einer Konzentration von 10 ng Plasmid/µl. Aus dieser wurde die Transfektionslösung mit 5 µg Gesamt-Plasmid sowie 30 µg Polybren in 3 ml Ham's F12 angesetzt, und auf die am Vortag mit 5×10^5 Zellen pro Kulturschale (Ø 92 mm, Nunc) ausgesäten Zellen gegeben. Nach 6 h bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen für 4 min bei RT mit 30 % DMSO in Ham's F12, 10 % FCS versetzt, danach einmal mit PBS gewaschen und für 2 Tage in 10 ml Vollmedium (Ham's F12, 10 % NCS) weiter im Brutschrank inkubiert. Danach begann die Selektion mit der Zugabe des Selektionsmediums zunächst ohne MTX, dem nach einer Woche 50 nM MTX zugeben wurde. Auf den weiteren Selektionsstufen betrug die MTX-Konzentration 0,25, 2,5, 25 und 100 µM. Ab der 0,25 µM MTX-Stufe kam dialysiertes FCS anstatt NCS zum Einsatz, was zu einem schnelleren Wachstum der Klone führte.

Auf jeder Amplifikationsstufe erfolgte die Isolierung von resistenten Kolonien (Klone) (Ausbubel *et al.* 1992) und deren Überprüfung mittels ELISA auf HCII-Expression. Bis zur 0,25 mM MTX-Selektionsrunde konnte HCII erst nach Konzentrierung (s. Abschnitt 3.4) detektiert werden und eine Quantifizierung war sehr ungenau, so daß die Auswahl der Klone für die nächste Selektionsrunde mit 2,5 µM MTX „blind“ erfolgen mußte. Das Auswahlkriterium war neben der HCII-Produktivität auch schnelles Wachstum der Klon-Kolonien.

1.2.2 HepG2-Zellen

Bei den Hepatoma-Leberzelllinien PLC/PRF-5 und HepG2 ist eine Sekretion von HCII beschrieben worden (Jaffe *et al.* 1985 bzw. Hortin *et al.* 1986). HepG2 ist eine Leber-Zelllinie, die einem humanem Hepatoblastom entstammt (Aden *et al.* 1979) und etliche leberspezifische Funktionen erhalten hat (Darlington 1987). Eine HCII-Synthese wurde in dieser Zelllinie nachgewiesen (Hortin *et al.* 1986, Ragg & Preibisch 1988). Die verwendeten Zellen wurden von der *European Collection of Cell Cultures* (Nr. 85011430, ECACC, GB) bezogen und befanden sich in der 90ten Passage. Als Anzucht-Medium kam DMEM, 2mM Gln, Pen./Strep., 10% FCS zum Einsatz. Für die Produktion und Aufreinigung von HCII wurden die HepG2-Zellen mit PBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen, und für 3 Tage in serumfreiem Medium (DMEM, 2mM Gln, Pen./Strep., HT/RI) inkubiert. Die Abwesenheit von FCS im Überstand garantierte, daß kein Rinder-HCII mit in die Aufreinigung gelangte.

1.2.3 IMR-90-Zellen

IMR-90 Zellen sind fötale Lungenfibroblasten, die aus dem Gewebe eines 16 Wochen alten humanen Fötus isoliert wurden (Nichols *et al.* 1976). Sie sind nicht potentiell unsterblich wie transformierte Zelllinien, sondern ihre Teilungsfähigkeit nimmt mit jeder Passage ab. Die Lebensspanne beträgt 58 bis 71 Zellteilungen. Passage 10-12 wird als juvenil angesehen, 13-15 als mittelalt und 16-18 als seneszent (Ehler 1996). Eine Passage entspricht etwa 1-3 Zellteilungen – je nach Verdünnung. IMR-90 wird üblicherweise als Fibroblastenzelllinie bezeichnet. Nach Ehler *et al.* (1996) sind IMR-90 allerdings als Myofibroblasten einzustufen. Die von der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) als ca. 70 % konfluente Kultur gelieferten Zellen befanden sich in der 9. Passage. Die Zellen wurden sofort trypsinisiert und zwei T25-Flaschen (10. Passage) angeimpft. Die weitere Expansion erfolgte nach vier Tagen durch Verteilen der konfluenten Kulturen auf je drei neue T25-Flaschen (11. Passage). Nach der 12. Passage wurden die konfluenten Kulturen trypsinisiert und zur Lagerung eingefroren. Demnach befanden sich die Zellen nach dem Auftauen in der 13. Passage. Die weiteren Subkultivierungen erfolgten durch 1:3- bis 1:6-Verdünnungen mit einer Einsatzzellichte von $2-3 \times 10^4$ Zellen/cm².

Medium: DMEM, 2 mM Gln, 3 g/l Glucose, Pen./Strep., 10 % FCS

1.2.4 A549-Zellen

Diese Zelllinie entstammt einem humanem Lungenkarzinom und entspricht Alveolarepithelzellen vom Typ II (Lieber *et al.* 1976). Dieser Zelltyp sekretiert u. a. antikoagulant wirkende Proteoglykane und Glykosaminoglykane (Berry *et al.* 1991). Die A549-Zellen (Nr. 86012804, ECACC,GB) wurden in der 85. Passage von der ECACC bezogen.

Medium: DMEM, 2 mM Gln, 3 g/l Glucose, Pen./Str., 10 % FCS

1.2.5 Rinderaorta-Endothelzellen (BAEC)

BAEC (*bovine aortic endothelial cells*) werden häufig als *in vitro*-Endothelmodell kultiviert und auch für die Präparation von extrazellulärer Matrix verwendet (s. Abschnitt II.4.6). Bei den verwendeten BAEC handelte es sich um eine Zelllinie von begrenzter Lebensdauer, die aus einer Primärkultur von Rinderaorta-Endothelzellen stammt. Sie wurde ursprünglich von Prof. Dr. J. Rauterberg (Institut für Arterioskleroserecherche, Universität Münster) zur Verfügung gestellt und von S. Duvar in der AG Zellkulturtechnik propagiert (Duvar 1992 und 1996, Müthing *et al.* 1996). Die Zellen befanden sich in der 9. bis 11. Passage.

Medium: DMEM, 2 mM Gln, 10 % FCS, Pen./Strep.

1.3 Stammhaltung

Zur Kultivierung wurden Zellkulturflaschen, sogenannte T-Flaschen (Nunc, Wiesbaden), mit Wachstumsflächen von 25, 80 bzw. 175 cm² und jeweils 8, 20 und 70 ml Füllvolumen verwendet. Zellkulturplatten mit 5 und 9,2 cm Durchmesser (Nunc, Wiesbaden) kamen bei der CHO-Transfektion/Koamplifikation zum Einsatz. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank (Forma Scientific) in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre und 7,5 % (v/v) CO₂. Die erhöhte CO₂-Spannung diente der pH-Pufferung der Kulturen und erforderte entsprechende Zugaben von Hydrogencarbonat zum Medium.

1.4 Kryokonservierung

Die Langzeitlagerung und Bevorratung von Zellen erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei ca. -180 °C in einem isoliertem Tank (Biosafe, Messer-Griesheim).

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit 120 x g abzentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus), in Einfriermedium (jeweiliges Kulturmedium + 10 % DMSO) aufgenommen und in 1,8 ml Kryoröhrchen (Nunc) direkt in die Gasphase des Stickstofftanks gegeben (Lindl & Bauer 1994).

Das Auftauen erfolgte im Wasserbad mit anschließender Überführung der Zellen in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc), in das 8 ml 4 °C kaltes Medium vorgelegt war. Durch Zentrifugation bei 120 x g wurde das zytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) des Einfriermediums entfernt. Das Zellpellet konnte dann in entsprechendem Medium resuspendiert und in Kultur genommen werden.

1.5 Passagieren der Zellen

Um adhärent wachsende Zellen zu propagieren, erfolgte alle 3-5 Tage eine Subkultivierung. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe der Protease Trypsin und mit EDTA, einem Ca^{2+} -Chelator, voneinander und von der Unterlage abgelöst (Lindl & Bauer 1994). Beide Substanzen waren zytotoxisch und mußten rechtzeitig inaktiviert werden. Dazu reichte das Aufnehmen der Zellsuspension in serumhaltigem Medium. Die nachfolgende Verdünnung der Zellsuspension richtete sich nach dem Zelltyp. Neue Kulturgefäße wurden mit mindestens 2×10^4 Zellen/cm² angeimpft.

Passagieren

PBS-Puffer:

NaCl (137 mM)	8,00 g
KCl (2,7 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O (5,4 mM)	1,44 g
KH ₂ PO ₄ (1,8 mM)	0,24 g
mit Milli-Q auf 0,8 l auffüllen, auf pH 7,4 einstellen und auf 1 l auffüllen	

Trypsin/EDTA-Lösung: 0,05 % (w/v) Trypsin (Sigma), 0,02% EDTA in PBS

- altes Medium entfernen
- gleiche Menge PBS zugeben, 10 x schwenken
- PBS entfernen
- soviel Trypsin/EDTA-Lösung zugeben, daß die Zellen gerade bedeckt sind
- bei 37 °C 3-5 min bei mikroskopischer Kontrolle inkubieren, bis alle Zellen abgerundet sind und sich durch leichtes Schwenken oder Stoßen von der Unterlage lösen lassen
- frisches serumhaltiges Medium zugeben
- evtl. Zellen nach Trypanblau-Färbung zählen, um Viabilität der Kultur zu überprüfen (s. Abschnitt II.1.7)
- 1:3 bis 1:10 verdünnen und neue Kulturgefäße animpfen

1.6 Mycoplasmen-Test (DAPI-Färbung)

Mycoplasmen sind die kleinsten bekannten Prokaryoten. Sie besitzen keine Zellwände und parasitieren häufig auf der Plasmamembran tierischer Zellen. Dabei können sie dem Kulturmedium Arginin entziehen (Schlegel 1985). Kontaminationen mit Mycoplasmen stellen eine stetige Gefahr in der Zellkultur dar, weil sie wegen ihrer Flexibilität und geringen Größe von 100-250 nm Sterilfilter mit einer nominellen Porengröße von 0,2 µm passieren können. Eine Mycoplasmen-Kontamination macht sich häufig durch hohen Arginin-Verbrauch und schlechtes Zellwachstum bemerkbar. Am schnellsten lassen sie sich durch Anfärben ihrer DNA mit dem DNA-bindenden Fluorochrom DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) sichtbar machen (Lindl & Bauer 1994; Russel *et al.* 1975). Die verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mit der DAPI-Färbung auf Mycoplasmen fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

DAPI-Färbung

- DAPI-Stammlösung (50 x): 5 µg/ml DAPI (Serva) in H₂O, 0,2 ml Aliquots bei -20 °C lagern
- 0,2 ml DAPI-Stammlösung mit PBS auf 10 ml auffüllen (= 0,1 µg/ml)
- Medium entfernen, einmal mit PBS waschen
- Zellen mit DAPI-Lösung 15 min bei 37 °C im Brutschrank färben
- Färbelösung abgießen, 3 x mit PBS waschen, Platte trocknen lassen, Deckglas mit etwas Mowiol (s. Abschnitt II.4.3) auf Kultur legen.
- Mit 100 x Ölimmersionsobjektiv mikroskopieren (s. Abschnitt II.4.4)

1.7 Trypanblau-Ausschlußfärbung

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte durch Versetzen von 50 µl Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung (0,4 %, Sigma) und anschließender lichtmikroskopischer Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer (Lindl & Bauer 1994). Als tote Zellen werden blau gefärbte Zellen definiert, da lebende Zellen wegen ihrer intakten Membran den Farbstoff nicht aufnehmen.

1.8 Superspinner-Kultivierung

Für die Kultivierung der CHO_{HClI}-Zellen im 1-L-Maßstab kam der Superspinner zum Einsatz. Dieser wurde in der AG Zellkulturtechnik entwickelt (Lehmann *et al.* 1992, Heidemann *et al.* 1994) und hergestellt. Er verbindet die Vorteile einer Spinnerflasche – einfache Handhabung im Brutschrank – mit den Vorteilen eines membranbegasten Bioreaktors, wie schonende aber effiziente O₂-Versorgung der Zellen bei voller Ausnutzung des Gefäßvolumens. Der Superspinner besteht aus einer 1-L-Borosilikatglasflasche (Duran, Schott), die mit zusätzlichen verschließbaren Öffnungen versehen ist. Am zentralen Deckel ist ein PTFE-Taumelrührer mit integriertem Magnet befestigt, auf dem sich 3 m hydrophobe mikroporöse PP-Schlauchmembran (Accurel, Akzo-Nobel) zur Begasung befinden. Die Taumelbewegung des Rührers wird von unten durch einen Drehfeldrührer (40 UpM) induziert. Das gesamte System mit Probenahme-Leitung, Gaszufuhr- und Abluftleitungen und Luftfiltern (Millipore) läßt sich im Autoklaven sterilisieren.

Der Superspinner wurde im CO₂-Brutschrank (Forma Scientific) betrieben, wobei die Gaszufuhr mit dem konditionierten Gasgemisch des Brutschranks durch eine Membran-Pumpe (Whisper 500, Japan) erfolgte. Daneben wurde der Superspinner auch im Brutraum betrieben. Dafür war die Gaszufuhr mit Schwebekörperdurchflußmessern auf ein CO₂/Luftgemisch mit 5% (v/v) CO₂ eingestellt. Das Gasgemisch wurde zur Erhöhung des Wasserdampfdrucks durch eine Wasserflasche geleitet.

Auf eine Silanisierung der Glasoberfläche konnte verzichtet werden, da die verwendeten Zellen im gesamten Kulturverlauf nicht daran adhärirten.

Die Kultivierung wurde als wiederholter satzweiser Betrieb durchgeführt. Bei diesem Kultivierungsmodus wird bei Erreichen der vorgesehenen Zelldichte die Zellsuspension bis auf ein Restvolumen abgelassen und frisches Medium aufgefüllt. Die Startzelldichte am Anfang jeden Satzes betrug mindestens 2×10^5 Zellen/ml, um ein sicheres Anwachsen der Kultur aufgrund autokriner Wachstumsfaktoren zu gewährleisten. Durch dieses schrittweise Ausverdünnen des ursprünglich 2 % FCS enthaltenden Mediums wurden die Zellen durch Einsatz entsprechender Medien in serumfreies Medium überführt. Um Nährstofflimitierungen zu vermeiden, war es erforderlich, während der Kultivierung die Glukose und Aminosäurekonzentrationen im Überstand zu messen (Büntemeyer *et al.* 1991), so daß das Medium bedarfsgerecht supplementiert werden konnte.

Medien für die Superspinnerkultivierung:

Satz 1: DMEM/F12 + 2 % FCS + Pen/Strep.

Satz 2+3: DMEM/F12 + 1 g/l BSA, + 3 mM Gln, + RI/HT, Pen./Strep.

Satz 4: DMEM/F12 + 0,5 g/l BSA, + Aminosäuren (s. Tab. 6), 3 g/l Gluc., RI, HT, Pen./Strep.

Diese Umstellung auf serumfreies Medium war für die nachfolgende Aufreinigung des rekombinanten, humanen HCII notwendig, um eine Verunreinigung des Produktes mit Rinder-HCII aus dem fötalen Kälberserum zu vermeiden.

Tab. 6: Aminosäure-Zusätze zum Medium im Satz 4.

Um eine Aminosäurelimitierung auszuschließen, wurden dem Medium im 4. Satz Aminosäuren zugegeben. Die zugegebenen Mengen berechneten sich nach den Aminosäure-Verbrauchsdaten, die im Satz 1 und 2 ermittelt wurden und sollten eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml am Ende eines Satzes ermöglichen.

Aminosäure	mmol/l	Aminosäure	mmol/l
Glu	0,90	Trp	0,05
Asn*H ₂ O	0,10	Phe	0,10
Ser	0,60	Ile	0,20
Gln	4,00	Leu	0,30
His*HCl*H ₂ O	0,10	Cys*HCl	0,20
Tyr	0,20	Cys-Cys	0,20
Met	0,10	Pro	0,15
Val	0,50		

1.9 Spezielle Kulturbedingungen

1.9.1 Hemmung der N-Glykosylierung

Um die N-Glykosylierung von HCII in CHO_{HCII}- und HepG2-Zellen spezifisch zu inhibieren, wurde dem Medium Tunicamycin zugegeben (Duksin & Mahoney 1982). Tunicamycin (Abb. 12) ist ein Nukleosid-Antibiotikum, das aus *Streptomyces lysosuperificus* isoliert wird und durch seine hohe Affinität zu GlcNAc-1-P-Transferase die N-Glykosylierung unterdrückt (Elbein 1987). Dieses Enzym katalysiert den ersten Syntheseschritt des Dolicholphosphat-gebundenen Oligosaccharids, das allen N-Glykosylierungen gemeinsam ist (Stryer 1990). Alle Kulturüberstände wurden vor dem Auftragen auf die Heparin-Sepharose-Säule mittels Dialyse entsalzt.

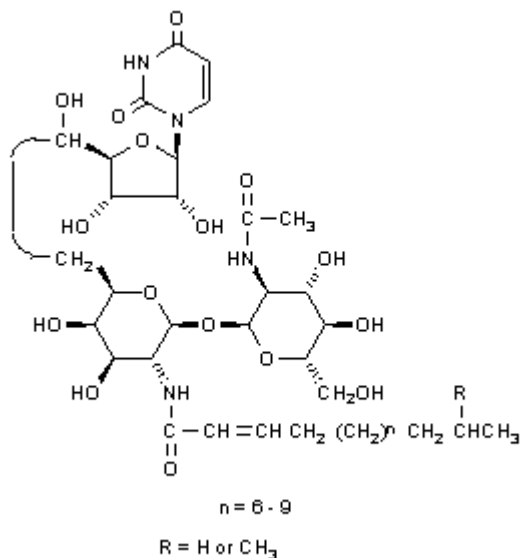


Abb. 12: Tunicamycin

Produktion von nicht N-glykosyliertem HCII aus CHO_{HCII}- und HepG2-Zellen mit Tunicamycin

Tunicamycin-Stammlösung: 5 mg Tunicamycin (T7765, Sigma) in 1 ml DMSO, bei -20 °C lagern

- Anzucht in T175-Flaschen (70-95 %- konfluent) im jeweiligen Anzuchtmedium:
 - CHO_{HCII}: DMEM/F12 + 3 mM Gln + Pen./Strep. + 10% FCS
 - HepG2 : DMEM + 3mM Gln + Pen./Strep. + 10% FCS
- 2x waschen mit serumfreiem Medium:
 - CHO_{HCII}: DMEM/F12 + 3 mM Gln + Pen./Strep. + RI/HT + 1g/l BSA
 - HepG2 : DMEM + 3 mM Gln + Pen./Strep. + RI/HT + 1 g/l BSA
- Zellen in 50 ml serumfreiem Medium (s. o.) mit 0, 0,2, 1, 2 mg/l Tunicamycin, 4 h inkubieren
- Kulturüberstand verwerfen und 75 ml serumfreies Medium (s.o.) mit 0, 0,2, bzw. 1,2 mg/l Tunicamycin zugeben, 3 d inkubieren
- Überstand mit 1/100 Vol. PMSF (100 mM in Isopropanol) versetzen, zentrifugieren (10.000 x g)
- ü. N. dialysieren (12-14 kD MWCO, Medicell) in 2 x 5 l 20 mM Tris/HCl 2 mM EDTA, pH 7,4

1.9.2 Hemmung der Sulfatierung

Die Sulfatierung von Tyrosinresten ist eine häufige posttranslationale Modifikation (Huttner 1982 u.1987) und wurde bei HCII an den Tyrosin-Resten 60 und 73 nachgewiesen (Hortin *et al.* 1986). Die Tyrosylprotein-Sulfotransferase überträgt dabei Sulfatreste von Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS) auf Tyrosinreste im *trans*-Golgi-Apparat (Niehrs *et al.* 1994). Die PAPS-Synthese wird durch das Substrat-Analogon Chlorat kompetitiv gehemmt (Baeuerle & Huttner 1986).

Auch CHO-Zellen führen diese Tyrosin-Sulfatierung durch, die jedoch unvollständig sein kann (Mikkelsen *et al.* 1991). In der Zellkultur kann die Sulfatierung durch kompetitive Inhibitoren gehemmt werden, wobei Chlorat die effektivste Wirkung zeigt (Baeuerle & Huttner 1986). Einem sulfatfreien Medium wird dazu 1-100 mM Na-Chlorat zugegeben.

Die Versuche wurden sowohl mit üblichem DMEM/F12 (enthält 0,4 mM SO_4^{2-}) durchgeführt als auch mit einem sulfatdefizienten DMEM/F12-Medium (D9785, Sigma), dem bestimmte Komponenten (MgSO_4 , Lys, Leu, Met, Gln, CaCl_2 , MgCl_2) fehlen und das bis auf Sulfat entsprechend der originalen DMEM/F12-Rezeptur supplementiert wurde. Die Überstände wurden für die Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie mittels Dialyse entsalzt.

Gewinnung von rekombinantem HCII aus Chlorat-behandelten Zellen

Chlorat-Medien:

DMEM/F12 (32500, Life Technologies) + 2 mM Gln
 + Pen./Strep.
 + RI
 + 0,5 g/l BSA
 + 0, 3 oder 10 mM NaClO_3

DMEM/F12 (D-9785, Sigma) + 4500 μM Gln
 + 450 μM Leu
 + 500 μM Lys
 + 116 μM Met
 + 707 μM MgCl_2
 + 1051 μM CaCl_2
 + 23 μM Phenolrot
 + Pen./Strep.
 + RI
 + 0,5 g/l BSA
 + 0, 3, 10 u. 20 mM NaClO_3

Durchführung:

Anzucht von CHO_{HCII} in T175-Flaschen (70- 95 % konfluent) in:

DMEM/F12 + 3 mM Gln + Pen./Strep. + 10 % FCS

- 2 x waschen mit serumfreiem Medium:

EM/F12 + 3 mM Gln + Pen./Strep. + RI/HT + 1 g/l BSA

- in 50 ml serumfreiem Chlorat-Medium (s. o.) mit 0, 3, 10 bzw. 20 mM Na-Chlorat für 4 h inkubieren
- Kulturüberstand verwerfen und 75 ml serumfreies Medium (s.o.) mit 0, 3, 10 bzw. 20 mM Na-Chlorat zugeben, für 2-3 d inkubieren
- Überstand mit 1/100 Vol. PMSF (100 mM in Isopropanol) versetzen, zentrifugieren 10.000 x g, 4 °C
- ü. N. dialysieren (12-14 kD MWCO, Medicell) in 10 Liter 20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
- dialysierte Überstände einfrieren (-80 °C)

1.10 Zellspezifische Parameter

Zur Charakterisierung des Wachstums- und Produktionsverhaltens der Zellen wurden zellspezifische Parameter (Pirt 1987) wie folgt bestimmt:

Wachstumsrate μ [d^{-1}]:

$$\mu = dx/dt \cdot 1/x \quad (4)$$

spezifische Substratverbrauchsrate q_s [$\mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot d)$]:

$$q_s = - dc_s/dt \cdot 1/x \quad (5)$$

spezifische Produktbildungsrate q_p [$\mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot d)$]:

$$q_p = dc_p/dt \cdot 1/x \quad (6)$$

mit

x Lebendzellendichte [$1/\text{ml}$]

t Zeit [d]

c_s Substratkonzentration [$\mu\text{mol/l}$]

c_p Produktkonzentration [$\mu\text{mol/l}$]

2 Expression der Deletionsmutanten HCII Δ 51-76 in *Escherichia coli*

HCII Δ 51-76 zeichnet sich durch eine Deletion der Aminosäuren 51-76 aus, die im N-terminalen Bereich von HCII eine saure Domäne bilden. Nach dem Modell von Ragg *et al.* 1990 a,b) konkurriert diese saure Domäne intramolekular mit Heparin oder Dermatasulfat um die Glykosaminoglykan-Bindungsstelle, so daß deren Deletion zu einer erhöhten Affinität zu Heparin und Dermatasulfat führt. HCII Δ 51-76 sollte eingesetzt werden, um potentielle Glykosaminoglykan-abhängige Wirkungsorte von HCII in der extrazellulären Matrix zu identifizieren.

Dies machte die Etablierung eines Expressionssystems notwendig, um dafür ausreichend Protein im Milligramm-Maßstab herzustellen. Da für diese Versuche posttranslationale Modifikationen des HCII Δ 51-76 nicht wichtig waren, konnte die Mutante in *E. coli* produziert werden. Es kam ein induzierbares Expressions-System (pET) zum Einsatz, das hohe Expressionsraten des heterologen Proteins zuließ. Induktions- und Kulturbedingungen wurden optimiert, um eine möglichst hohe Ausbeute an aktivem Protein zu erzielen. Überexprimierte Proteine werden in *E. coli* häufig in unlöslicher denaturierter Form in *inclusion bodies* abgelagert und können nach Lösen in Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid in vielen Fällen renaturiert werden. Alternativ kann durch geeignete Strategien versucht werden, den Anteil an löslichem nicht denaturiertem Zielprotein zu erhöhen (Schein 1989, Baneyx 1999).

2.1 pET-System

Für die Expression von HCII Δ 51-76 in *Escherichia coli* wurde das pET- System (Novagen) verwendet.

Hierbei handelt es sich um ein Expressionssystem, das den starken T7-Promotor sowie eine induzierbare T7 RNA-Polymerase benutzt, um eine hohe Expressionsrate zu erzielen. Die pET-Vektoren basieren auf dem Plasmid pBR322 (Studier & Moffat, 1986, Rosenberg *et al.*, 1987, Studier *et al.*, 1990). Die wichtigsten Elemente der pET-Vektoren sind die T7-Transkriptions- und Translationssignale, der T7-Promotor, sowie das Ampicillin-Resistenzgen *bla* (Novagen, 1997). Zur effektiven Expression – bis zu 50 % des gesamten Zellproteins nach wenigen Stunden Induktion – wird das pET-System in Kombination mit dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet.

Dem *E. coli* B-Stamm BL21 fehlt das Protease-Gen *lon* und das Membranprotease-Gen *ompT*, deren Genprodukte rekombinante Proteine während der Reinigung degradieren können (Grodberg & Dunn, 1988). BL21(DE3) ist ein Lysogen des Phagen λ DE3, einem λ -Phagen-Derivat mit Phagen-21-Immunitätsregion. Der Stamm trägt ein in das *int*-Gen inseriertes DNA-Fragment mit dem *lacI*-Gen, dem *lacUV5*-Promotor und dem T7-RNA-Polymerase-Gen (Studier & Moffat, 1986). Das defekte *int*-Gen des λ DE3-Phagen verhindert seine Integration in das Wirtschromosom bzw. dessen Verlassen ohne Helferphagen.

Für die Expression eines eukaryotischen Zielgens wird der auf dem Plasmid pBR322 basierende Translationsvektor pET-23 benutzt, der die hoch effiziente Ribosomen-Bindungsstelle des T7-Phagen enthält.

Zur Induktion wurde das Galactoseanalogon Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) benutzt. IPTG bewirkt nach Bindung an den *lacI*-Repressor ein Freigeben des *lac*-Operators, so daß der *lacUV5*-Promotor eine Transkription des in den Vektor integrierten Fremdgens durch die T7-RNA-Polymerase ermöglicht. Um den Selektionsdruck in der wachsenden Kultur zu gewährleisten, kam das mit Ampicillin verwandte Carbenicillin zum Einsatz, da es unempfindlicher als Ampicillin gegen niedrige pH-Werte ist, die im Kulturverlauf auftreten können (Novagen, 1997).

2.1.1 Herstellung von *E. coli* BL21(DE3)/pCBO1

Die Herstellung der Deletionsmutanten p Δ 51-76 wurde von H. Ragg und Mitarbeitern (Ragg *et al.*, 1990a) durchgeführt. Die Umklonierung in den Vektor pET-23c(+) und die Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) nahm S. Brinkmeyer in der *AG Zelluläre Genetik* vor.

Hierzu wurde zunächst ein 1563 Bp PCR-Produkt des Plasmids p Δ 51-76 mit den Primern HC2/1641/- und *NdeI*-Gly I hergestellt und *blunt end* in die *Srf I* Schnittstelle des pCR-Script Amp sk(+) Cloning-Vector (Stratagene) subkloniert.

Primer	
HC2/1641/-	Eigenschaft: 5'-Ende bei 1641 Bp* im nichtkodierenden 3'-Bereich der HCII-cDNA, (-)-Strang 5'>3'-Sequenz: HO-GCA TGG GCT ATT GTG CAG AAT T
<i>NdeI</i> -Gly I	Eigenschaft: <u><i>Nde I</i> Schnittstellen</u> im pET 23 Vektor (plus 10 Bp nach 5'), <u>Gly1 bis Asp 7</u> im HCII-(+)-Strang 5'>3'- Sequenz: HO-AGG AGA TAT <u>ACA TAT GGG</u> <u>GAG CAA AGG CCC</u> <u>GCT GCA T</u>
* Numerierung nach Ragg (1986)	

Mit dem so entstandenen Vektor pCBO2 erfolgte dann die Transformation des *E. coli*-Stamm Epicurian Coli XL 1 blue MRF Kan (Stratagene).

Ein *NdeI* und *EcoRI* Spaltprodukt (1485 Bp) aus pCBO2 wurde dann in den ebenfalls mit *NdeI* und *EcoR I* gespaltenen Vektor pET-23c(+) (Novagen) ligiert. Die Charakterisierung erfolgte über Restriktionsspaltung. Mit diesem Expressionsplasmid pCBO1 (Abb.13) erfolgte dann die Transformation des Expressionsstammes *E. coli* BL21(D3) (Novagen).

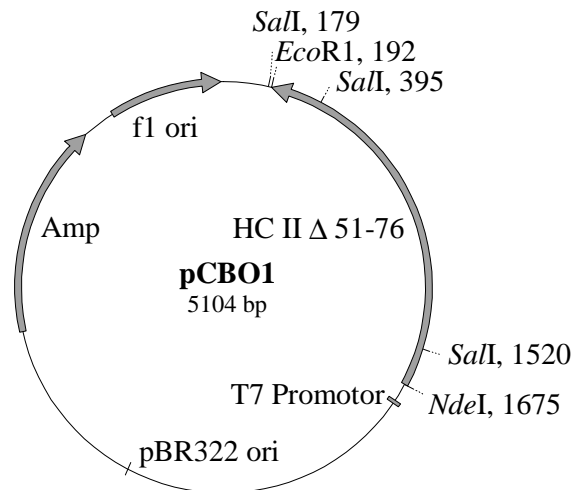


Abb. 13: Expressionsplasmid pCBO1, bestehend aus dem Vektor pET23c(+) mit einklonierter HCIIΔ51-76 cDNA.

Die Klone 1, 2, 3, 9 und 10 zeigten im ELISA und Western-Blot die stärkste HCIIΔ51-76 Expression. Für alle weiteren Versuche wurde der Klon 1 verwendet (*E. coli* BL21(DE3)/pCBO1 K1).

Die Kulturen wurden als Glycerinkultur bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert: 172 μl Glycerin 87 % (p.A., Merck, autoklaviert) + 328 μl Kultur.

2.2 Schüttelkolbenkultivierung

Zur Anzucht der Übernachtskultur wurde mit einer sterilen Glasspitze etwas von der tiefgekühlten Glycerinkultur abgeschabt und in 50 ml Medium ü. N. bei 150 UpM auf einem Schüttler bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ propagiert. Für die Schüttelkolbenkultivierung kamen 1-L-Schikanekolben (Schott) zum Einsatz, die mit 240 ml Medium und 10 ml Übernachtskultur angeimpft wurden. Bei einer Schüttlerdrehzahl von 220 UpM wurde zunächst bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen und dann mit 0,4 mM IPTG für 3 h induziert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert und danach lysiert oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Dem Zellaufschluß diente ein Triton-haltiger Tris-Puffer, der mit den Proteaseinhibitoren EDTA und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt war. Vor der Zellyse wurde das abzentrifugierte Pellet in 1/25 Volumen des ursprünglichen Kulturvolumens in Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluß mit Ultraschall (Sonifier 250, Branson) erfolgte auf Eis in Pulsen, bis in der lichtmikroskopischen Kontrolle (fast) keine intakten Bakterien mehr festzustellen waren. Nach der Lyse in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zugegebene DNase I verringerte die Viskosität des Lysats sowie störende Einflüsse der polyanionischen DNA im ersten Reinigungsschritt (Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie).

E. coli Schüttelkolbenkultivierung

Stamm:	E. coli B121(DE3)/pCBO1 K1
LB/Carb-Medium:	LB-Medium (Lennox L Broth Base, 12780-029, Gibco/Life Technologies), 20 g/l, 20 min autoklavieren, 1 ml/l Carbenicillin-Stammlsg.
Carbenicillin- Stammlösung:	50 mg/ml Carbenicillin (69101-1, Novagen) in Milli-Q, Lagerung bei - 20 °C
IPTG-Stammlösung (0,1 M)	2,38 g Isopropylthiogalactosid (Sigma) in 100 ml Milli-Q, sterilfiltrieren, Lagerung bei - 20 °C
Lysepuffer :	50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, pH 7,4
PMSF :	0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (P7626, Sigma) in Isopropanol

für 8 x 250 ml Schüttelkolben

Vorkultur:	- gefrorene (-80 °C) Glycerinkultur abschaben
	- ü.N. in 100 ml LB/Carb.-Medium anziehen bei 37 °C, Schüttler
Induktion:	- 8 x 250 ml LB/Carb-Medium pro 1-l-Schikane-Kolben mit ca 10 ml Vorkultur animpfen
	- 37 °C , Schüttler 220 UpM
	- bei OD ₆₀₀ 0,6 mit 1 ml/Kolben IPTG induzieren, Brutraum auf 25 °C einstellen
	- 3 h bei 25 °C
	- 5 min auf Eis stellen
	- Zellen abzentrifugieren: 5000 x g, 10 min 4 °C (Sorvall, GS3-Rotor)
Zellaufschluß:	- Zellpellet in 1/25 Vol. Lysepuffer und 1/100 Vol. 0,1 M PMSF auf Eis resuspendieren
	- Sonifier: 5 min 50 %, Stufe 3 auf Eis
	+ 1/20 Vol. 0,2 M MnCl ₂ (10 mM Endkonzentration)
	+ 1/100 Vol. DNase I (from Bovine Pancreas, 1 mg/ml, 4370U/mg, Amresco),
	- 30 min bei 37 °C inkubieren
	- zentrifugieren: 10.000 x g, 20 min, 4 °C

2.3 Expression im 5-l-Maßstab

Die Fermentation im 7-l-Bioreaktor (LAB 7 L, MBR) mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 5,5 l wurde mit T. Schäffer in der *AG Fermentationstechnik* (Leitung: Prof. Dr. E. Flaschel) der Technischen Fakultät durchgeführt.

Der Fermenteraufbau (Abb. 14) ist bei Schmidt (1998) und Miksch *et al.* (1997) beschrieben. Der pH-Wert wurde durch die Fermenterregelung mit 10 % H₃PO₄ und 2 N NaOH reguliert, und die Rührerdrehzahl bei Unterschreiten von 60 % Luftsättigung um jeweils 20 UpM zur Einhaltung eines ausreichenden O₂-Partialdruckes erhöht. Als Antischaummittel diente PE 8100 (BASF). Der Kopfraumüberdruck betrug 0,2 bar. Das am Vortag angesetzte Medium-Konzentrat (100 g LB-Medium in 300 ml Milli-Q) wurde in den Reaktor gegeben, auf 5 l aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen konnte dann durch ein Septum 5 ml Ampicillin (50 mg/ml, Sigma) entsprechend einer Endkonzentration 50 µg/ml zugegeben werden.

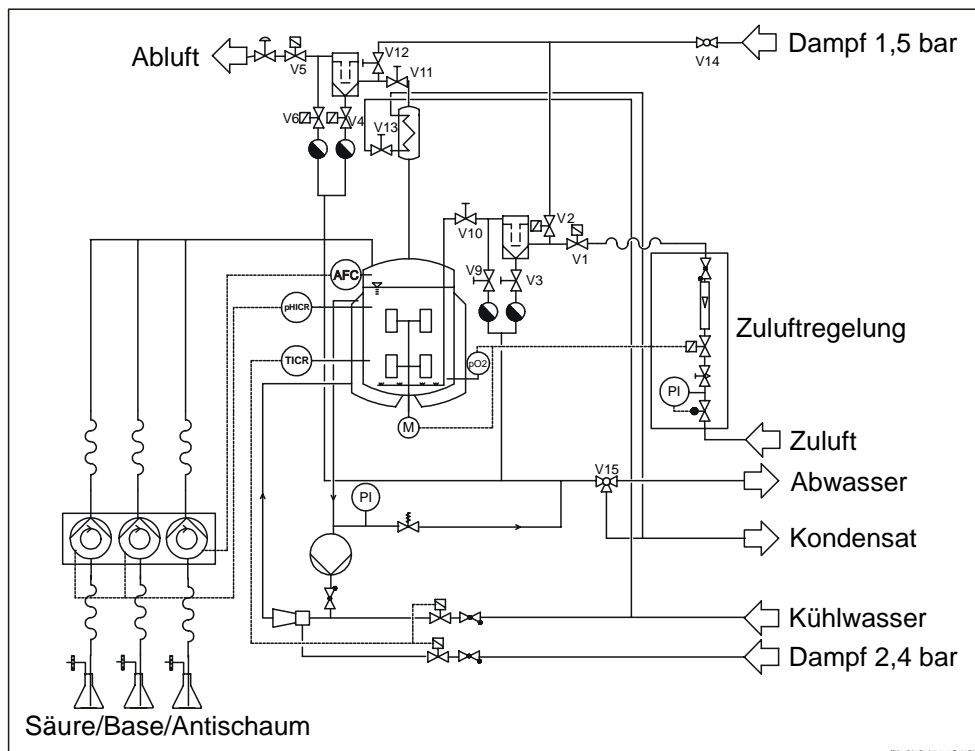


Abb. 14: Schematische Darstellung des 7-L-Bioreaktors (MBR) für die *E. coli*-Fermentation zur HCIIΔ51-76 Produktion.

Das Inokulum bestand aus 2 x 250 ml Übernachtskultur und wurde aus dem Animpfkolben mit einer Nadel bei reduziertem Kopfraumüberdruck in das Reaktorgefäß überführt und zunächst bei 37 °C kultiviert. Bei einer OD_{600} von 7,0 wurden 2,5 l Kultur abgelassen und verworfen und 2,5 l frisches Medium mit einer Pumpe zugegeben. Nach dem Herunterkühlen auf 25 °C erfolgte die Induktion mit 50 ml 40 mM IPTG (0,4 mM Endkonzentration). Nach 2,5 h Kultivierung in Gegenwart von IPTG wurde abgeerntet und die Zellen durch Zentrifugation des Kulturüberstandes für 20 min bei 5000 x g und 4 °C abgetrennt. Bis zum Zellaufschluß lagerten die Pellets ü. N. bei -80 °C. Die aufgetauten Pellets wurden dann in insgesamt 250 ml (1/20 Vol.) Lysepuffer (s.Abschn. II.2.2) mit 2 mM PMSF resuspendiert und in 3 Durchgängen mit einem Hochdruckhomogenisator (Mini-Lab Typ 8.30H, Rannie) aufgeschlossen. Danach folgten 3 Zentrifugationsschritte, um das Zellysate zu klären: 2 x 20 min bei 12.000 x g, 1 x 20 min bei 20.000 x g (RC5, Sorvall). Die Aufreinigung von HCIIΔ51-76 ist im Abschnitt II.3.3 beschrieben.

3 HCII-Reinigung

Für die Reinigung von HCII kam eine Kombination verschiedener Proteinreinigungsverfahren zum Einsatz, die fraktionierte Fällungen, chromatographische Verfahren, Umpufferungs- und Konzentrierungsschritte umfaßte.

Die HCII-Reinigungsstrategie für humanes Plasma-HCII folgte im wesentlichen der Beschreibung von Griffith *et al.* (1985) sowie der darauf beruhenden Beschreibung von Zhang *et al.* (1994) für die Reinigung von Maus-HCII.

Die Reinigung von rekombinantem HCII aus CHO-Zellen und HCII aus HepG2-Zellen entsprach im wesentlichen einer Plasma-HCII-Reinigung unter Ausschluß der PEG/BaCl₂-Fällungsschritte. Für die Isolierung des rekombinanten HCII Δ 51-76 aus *E.coli*-Kulturüberstand wurden einige Reinigungsschritte neu entwickelt.

3.1 Reinigung von Plasma-HCII

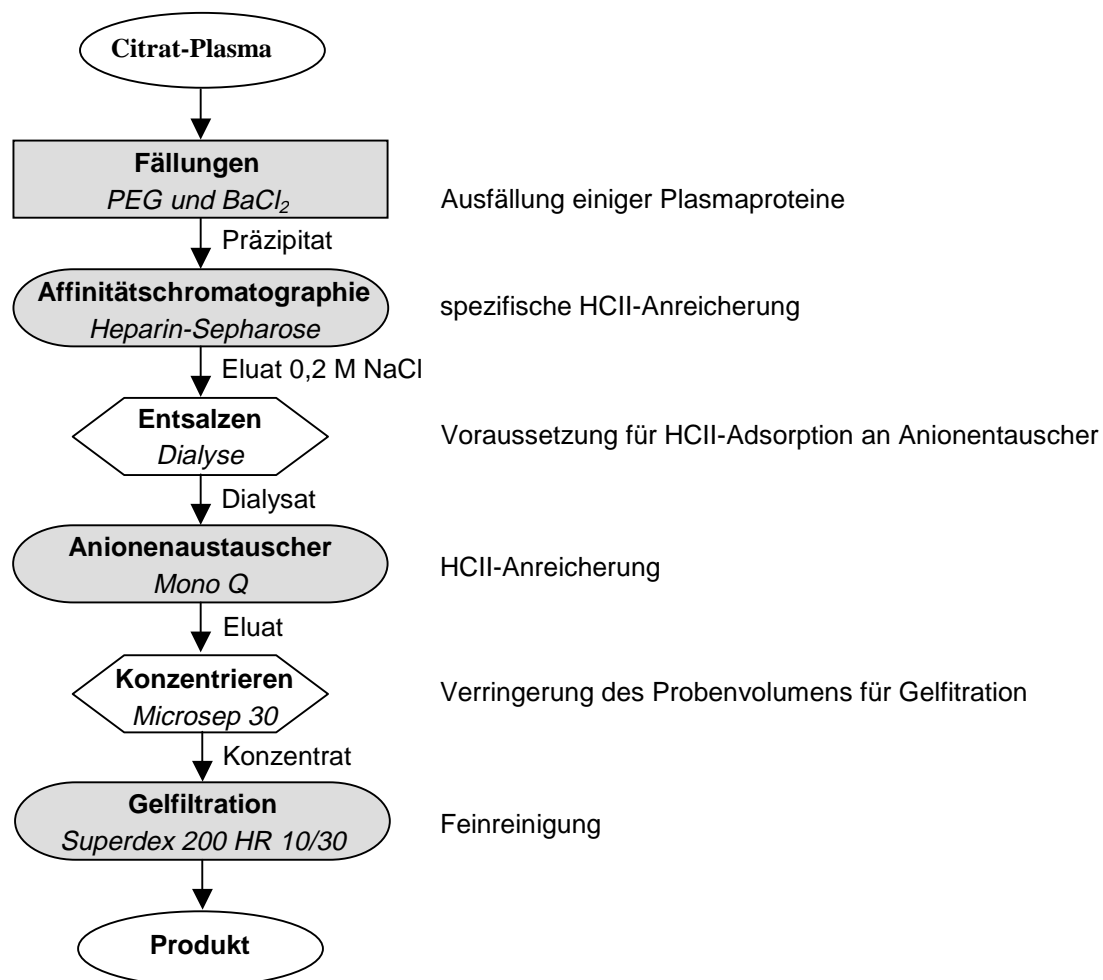


Abb. 15: Reinigungsschema von humanem Plasma-HCII

Wie in Abb. 15 zu ersehen, war die Reinigung von HCII aus humanem Citrat-Plasma ein vierstufiger Prozeß (Griffith *et al.* 1985). Zunächst sorgte eine fraktionierte PEG-Fällung in Kombination mit einer BaCl₂-Fällung für eine Anreicherung von HCII. Darauf folgten drei verschiedene Chromatographie-Schritte: Affinitäts- und Ionenaustausch-Chromatographie sowie abschließend eine Gelfiltration. Der Gelfiltrationsschritt kam lediglich für die Feinreinigung der HCII-Proben für die Glykosylierungsanalytik zum Einsatz.

Das Plasma-Ausgangsmaterial stammte von einzelnen Spendern und ist laut Hersteller negativ getestet bezüglich Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg) und Antikörper gegen HIV, HCV.

Die Durchführung der gesamten Reinigung ist am Ende des Abschnitt II.3.1 beschrieben. Zunächst werden die verwendeten Methoden allgemein vorgestellt.

3.1.1 PEG- und BaCl₂-Fällung

Bei der ersten Beschreibung von HCII wurde bereits PEG zur partiellen Reinigung verwendet (Briginshaw & Shanberge, 1974).

Polyethylenglycol (PEG) ist ein nicht denaturierendes wasserlösliches Polymer, das Proteine aus wässrigen Lösungen ausfällen kann. Dieser Effekt hängt von der PEG-Polymer- und Proteingröße ab und beruht hauptsächlich auf einem Volumenausschlußmechanismus (Ingham, 1990). Das Protein reichert sich mit steigender PEG-Polymerkonzentration im Extrapolymerraum an und unterschreitet dabei sein Löslichkeitsprodukt. Dieser Effekt ist relativ unabhängig von Ionenstärke und pH-Wert der Lösung. PEG wird ebenso wie die klassische Cohn-Fraktionierung mit kaltem Ethanol (Cohn *et al.* 1947, Marshall 1989) zur Plasma-Fraktionierung eingesetzt, ist demgegenüber aber schonender bei empfindlichen Proteinen und weniger temperatursensitiv (Hao *et al.* 1980). Darüber hinaus hat PEG nur eine geringe Lösungsenthalpie, so daß sich erforderliche Temperaturen leicht einhalten und reproduzieren lassen.

Der BaCl₂-Fällungsschritt bewirkte eine Ausfällung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren in Verbindung mit dem Citratzusatz im Ausgangsmaterial (Citrat-Plasma) durch Bariumcitrat-Präzipitation (Deacon & Howell 1976, Griffith *et al.* 1985).

3.1.2 Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen matrixgebundenen Liganden, der für das aufzureinigende Protein möglichst spezifisch sein sollte. Als Matrices werden offenporige Materialien mit großer spezifischer Oberfläche, hoher mechanischer Festigkeit und geringer unspezifischer Adsorption verwendet. Daran wird über aktivierte Gruppen der Ligand meist kovalent gekoppelt. Als Liganden kommen für die HCII-Reinigung insbesondere GAGs in Frage, aber auch andere Liganden wie z.B. Con A (Tollef-

sen *et al.* 1986, Sinniger *et al.* 1993) oder Ca-Spirulan (Hayakawa *et al.* 2000) sind beschrieben worden.

Immobilisiertes Heparin stellt einen vielseitigen Liganden zur Reinigung von Gerinnungsfaktoren (z.B. Thrombin, AT, Faktor IX, X, XI u. XII), Lipoprotein-Lipasen, Steroid-Rezeptoren, Hormonen, Interferon, Protein-Synthese-Faktoren und DNA-bindenden Proteinen dar (Amersham-Pharmacia 1999, Farooqui 1980). Der Grund für diese breite Spezifität liegt in der polyanionischen Struktur von Heparin mit einer hohen Dichte an negativen Ladungen (Kjellen & Lindahl 1991).

Eine kommerziell verfügbare Heparin-Affinitäts-Matrix stellt Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia) dar. Diese besteht aus Heparin, das an eine Bromcyan-aktivierte quervernetzte Agarose gekoppelt wurde (Tab. 7). Für die HCII-Reinigung wurde eine Heparin-Sepharose-Fertig-Säule (HiTrap Heparin, 5 ml Gelbettvolumen, Pharmacia) verwendet.

Tab. 7: Eigenschaften der verwendeten Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie-Matrizes (Herstellerangaben).

	Heparin-Sepharose CL-6B	HiTrap Heparin-Sepharose
Hersteller	Pharmacia	Pharmacia
Matrix	quervernetzte Agarose, 6%	Quervernetzte Agarose, 6%
Heparin	aus Darm-Mukosa (Schwein)	aus Darm-Mukosa (Schwein)
Kopplungsmethode	Bromcyan	N-Hydroxysuccinimid
gekoppeltes Heparin	2 mg /ml Gel	10 mg/ml Gel
Ausschlußgrenze (Mr)	6×10^6 D	4×10^6 D
Partikel-Größe	45-165 μ m	34 μ m

3.1.3 Ionenaustausch-Chromatographie

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie binden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkung an eine positiv oder negativ geladene Matrix (Choudhary & Horvath 1996). Das Protein konkurriert dabei mit den Salzionen des Laufmittels um die Gegenladungen der stationären Phase. Starke Ionenaustauscher mit geladenen Gruppen wie der Sulfomethylgruppe für Kationenaustauscher oder quarternären Ammoniumverbindungen, z.B. der Trimethylaminoethylgruppe für Anionenaustauscher behalten über einen weiten pH-Bereich ihren Ladungszustand bei. Die Affinität zur Ionenaustauschermatrix steigt mit dem Betrag der Nettoladung des Proteins. Diese kann abhängig vom isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins durch den pH-Wert der mobilen Phase ($\text{pH} > \text{pI}+1$ bei Anionenaustausch bzw. $\text{pH} < \text{pI}-1$ bei Kationenaustausch) beeinflusst werden. Die Elution erfolgt entweder mit einem pH- oder Salzgradienten (Lottspeich 1998).

Für die HCII-Reinigung aus Plasma und Zellkulturüberständen wurde die Anionenaustauschersäule Mono Q HR 5/5 (Zhang *et al.* 1994) verwandt, während bei der HCII Δ 51-76-Reinigung eine Kationenaustauscher-Säule (1 ml, Resource-S) zum Einsatz kam (Tab. 8).

Tab. 8: Eigenschaften der verwendeten Ionenaustauscher-Säulen (Herstellerangaben).

Bezeichnung	Mono Q (Pharmacia)	Resource S (Pharmacia)
Typ	starker Anionentauscher	starker Kationentauscher
geladene Gruppe	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
Matrix	hydrophiler Polyether	Polystyrol, quervernetzt mit Divinylbenzol
Partikelgröße	10 μm	15 μm
Bettvolumen	1 ml	1 ml
Abmessungen	5 x 50 mm	6,4 x 30 mm
max. Druck	5 MPa	1,5 Mpa
empf. Fluß	0,5 - 2 ml/min	1 - 10 ml/min
max. Beladungskapazität	65 mg/ml (HSA)	25 mg/ml
Ionenkapazität	320 \pm 50 $\mu\text{mol} (\text{Cl}^-)/\text{ml}$	k.A.
totale Bindungskapazität	5 mg/Säule	k.A.

3.1.4 Gelfiltration

Die Gelchromatographie ist eine Ausschlußchromatographie und trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe. Das Prinzip beruht auf der moleküldurchmesserabhängigen Permeation der stationären Phase, die eine kontrollierte Porengröße besitzt. Molekülen, die größer als die Porengröße sind, steht für die Elution lediglich der extrapartikuläre Raum (Ausschlußvolumen V_0) zur Verfügung. Kleinere Moleküle können in die Poren eindringen, so daß sich ihre Elution entsprechend dem zugänglichen Porenvolumen verzögert. Ihr Elutionsvolumen V_r besteht aus dem zugänglichen internen Porenvolumen zuzüglich dem Partikelzwischenraum. Sehr kleine Eluenten durchdringen das Gelvolumen vollständig, so daß ihr Elutionsvolumen V_t dem gesamten Flüssigkeitsvolumen der Säule entspricht, bestehend aus dem Porenvolumen V_p zuzüglich dem Ausschlußvolumen V_0 (Janson & Rydén 1998). Für die Trennung spielt das Lösungsmittel keine große Rolle, so daß sich die Methode auch zum Umpuffern eignet. Nachteile der Gelfiltration sind die unvermeidliche Verdünnung der Probe (mindestens Faktor 3), der geringe Reinigungsfaktor (2-3) und das geringe Probenvolumen (< 2 % des Säulenvolumens). Für HCII wurde eine Superdex 200 HR 10/30 Säule (Gelbettvolumen 24 ml, Pharmacia) eingesetzt (Tab. 9).

Tab. 9: Eigenschaften der Gelfiltrationsäule (Herstellerangaben)

Bezeichnung	Superdex 200 HR 10/30 Säule
Matrix	quervernetztes Kopolymer aus Agarose und Dextran
Partikelgröße	13 μm (Mittelwert)
Trennbereich	10–600 kD (globuläres Protein)
Ausschlußgrenze	1.300 kD (globuläres Protein)
Gelbettvolumen (V_c)	24 ml
max. Druck	1,5 Mpa
max. Volumenstrom	1 ml/min
max. Fließgeschwindigkeit	76 cm/h
theoret. Bodenzahl	>30.000 m^{-1}

3.1.5 FPLC-System

Alle Chromatographiemethoden wurden mit einem FPLC-System (FPLC: *fast protein liquid chromatography*) von Pharmacia durchgeführt, das aus folgenden Komponenten bestand: Controller LCC-501 Plus, 2 Pumpen P500, Mixer, Injektionsventil MV-7, 2 Ventile MV-8, Leitfähigkeitsmonitor, UV280-Monitor UV-1, Schreiber REC-102 und einem Fraktions-sammler FRAC-100. Die Bedienung erfolgte wahlweise über die Controller-Konsole oder mit einem PC in Verbindung mit der FPLC-Director-Software (Version 1.10, Pharmacia).

Alle Puffer wurden im Ultraschallbad oder mit der Wasserstrahlpumpe entgast. Die Proben wurden zur Partikelabtrennung zentrifugiert (10.000 x g, 10 min) oder filtriert (0,22 µm). Die Lagerung der Säulen erfolgte in entgastem 20 %igem Ethanol p.A. bei 4 °C.

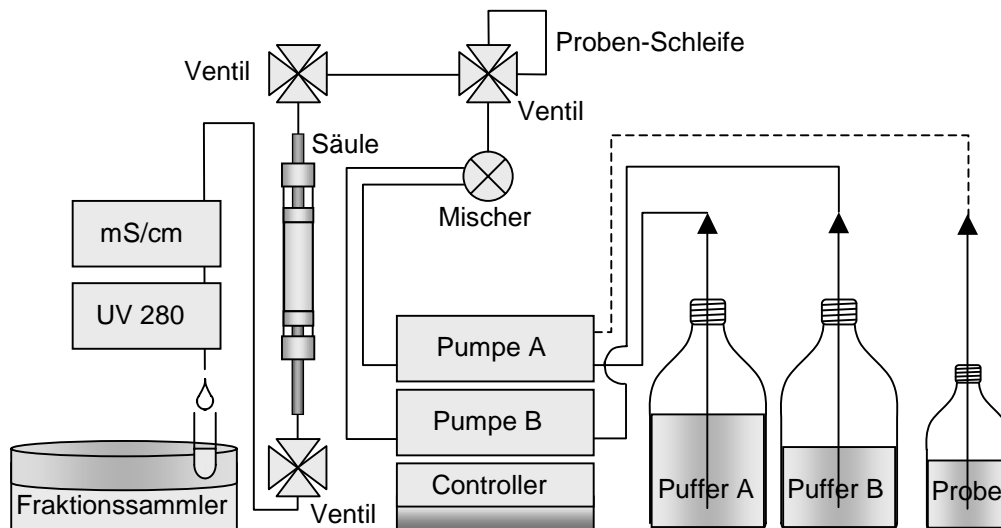


Abb. 16: Schema der Chromatographie-Anlage (FPLC).

Plasma-HCII-Reinigung**Material**

Source Plasma, for manufacturing use only, Sera-Tec Biologicals, North Brunswick, USA.
 Negativ getestet auf Antikörper gegen HIV, HCV und nichtreaktiv für HBsAg.
 Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Lösungen

1 M BaCl_2
 TC-Puffer: 50 mM Tris, 20 mM Zitronensäure, pH 7,4
 TCE-Puffer: 50 mM Tris, 20 mM Zitronensäure, 5 mM EDTA, pH 7,4
 20 mM Tris-HCl, pH 7,4

Durchführung

200-250 ml Plasma pro Aufreinigung. PEG, Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor und Benzamidin werden als Trockensubstanzen zugegeben.

Fällungen

- Auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorkühlen: 1 M BaCl_2 , Zentrifuge (Sorvall RC5C, Ausschwingrotor Sorvall HB-6), Duran-Flaschen
- ca. 200-250 ml Plasma auftauen ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, Wasserbad), bis gerade der letzte Eisklumpen verschwindet
- + Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor 20 mg/l Endkonzentration (T9003, Sigma)
- + Benzamidin (B 6506, Sigma), 5 mM, 918 mg/l Endkonzentration
- + 35 g PEG 8000 (P 2139, Sigma) pro l vorgelegtes Volumen zugeben
- 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ rühren
- zentrifugieren, $2640 \times g$, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Präzipitat verwerfen, Überstand in vorgekühlte Duran-Flasche
- + 1/10 Vol. 1 M BaCl_2 langsam tropfenweise über 15 min zugeben
- 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ rühren
- zentrifugieren (s.o.), Präzipitat verwerfen
- + 100 g PEG 8000 pro l vorgelegten Überstand zugeben
- 30 min bei RT rühren
- zentrifugieren, ($2640 \times g$, 30 min, RT) Überstand verwerfen
- Präzipitat in etwa gleichen Volumen TC-Puffer resuspendieren
- + 100 g PEG 8000 pro l vorgelegtes Volumen zugeben
- 60 min bei RT rühren
- zentrifugieren bei RT (s.o.), Präzipitat verwerfen
- + 150 g PEG 8000 pro l vorgelegtes Volumen zugeben
- 60 min bei RT rühren
- zentrifugieren bei RT
- + Präzipitat in TCE-Puffer lösen (entsprechend dem ursprünglich Plasmavolumen) in Überkopfschüttler (ü.N. bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei Bedarf am nächsten Morgen Restpellet bei RT lösen)
- zentrifugieren $10.000 \times g$, 10 min
- Pellet verwerfen

Plasma-HCII-Reinigung (Fortsetzung)

- **Heparin-Sepharose (HiTrap, 5 ml, Pharmacia)**

Puffer A	TCE-Puffer
Puffer B	TCE-Puffer, 0,2 M NaCl
Fluß	2 ml/min
Equilibrieren	5 cv Puffer A (cv = Säulenvolumen)
Auftragen	2 ml/min mit Pumpe A
Waschen	5 cv TCE-Puffer, 2 ml/min
Eluieren	Puffer B bis UV-Signal wieder bei Null
Fraktionsvol.	5 ml
Reinigen	5 cv TCE, 3 M NaCl, 2 ml/min
Poolen	HCII-Fraktionen

- **Dialyse**
- Dialyseschlauch (12-14 kD MWCO, Medicell) 3 x in Milli-Q auskochen
- Heparin-Sepharose-Eluat einfüllen, verknoten
- gegen 2 l 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 bei 4 °C für 1-2 h unter Rühren dialysieren (1-2 h reichen, um die Ionenstärke ausreichend herabzusetzen)

- **Mono Q HR 5/5**

Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
Puffer B	20 mM Tris-HCl, 0,7 M NaCl, pH 7,4
Fluß	1 ml/min
Vorbereiten	5 cv Puffer A (cv = Säulenvolumen) 10 cv Puffer B
Equilibrieren	5 cv Puffer A
Auftragen	1 ml/min mit Pumpe A
Waschen	Puffer A
Eluieren	50 ml linearer Gradient 0 - 0,7 M NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
Fraktionsvol.	1 ml
Poolen	HCII-Fraktionen (enthalten ca. 200-280 mM NaCl)

- **konzentrieren:** Microsep 30 (Pall/Filtron) (s. Abschnitt II.3.4)

- **Superdex 200 HR 10/30**

Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, filtrieren (0,2 µm, Sartolab P, Sartorius)
Equilibrieren	50 ml, 1 ml/min
Auftragen	200 µl mit dem Injektions-Ventil (200 µl Probenschleife) 0,25 ml/min, Fraktionsssammler gleichzeitig starten
Fraktionsvol.	0,5 ml
Elution	0,25 ml/min
Poolen	UV-Peak bei 13,5 ml, Fraktion 27 und 28

- **Lagerung**
gereinigtes HCII aliquotieren und bei -80 °C lagern

3.2 Reinigung von HCII aus CHO_{HCII}- und HepG2-Überständen

Die zu reinigenden Kulturüberstände von CHO_{HCII}, und HepG2-Zellen wurden zunächst mit 10 µM PMSF versetzt und mittels Dialyse entsalzt. Der Superspinner-Überstand war zuvor durch Ultrafiltration konzentriert worden (s. Abschnitt II.3.4).

<u>Dialyse von Kulturüberständen</u>	
-	Dialyseschlauch (12-14 kD MWCO, Medicell) 3 x in Milli-Q auskochen
-	Heparin-Sepharose-Eluat einfüllen, verknoten
-	gegen 5 l 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 µM PMSF, 5 mM NaCl, pH 7,4 bei 4 °C ü. N. unter Rühren dialysieren, nach einigen Stunden Dialysepuffer 1x wechseln

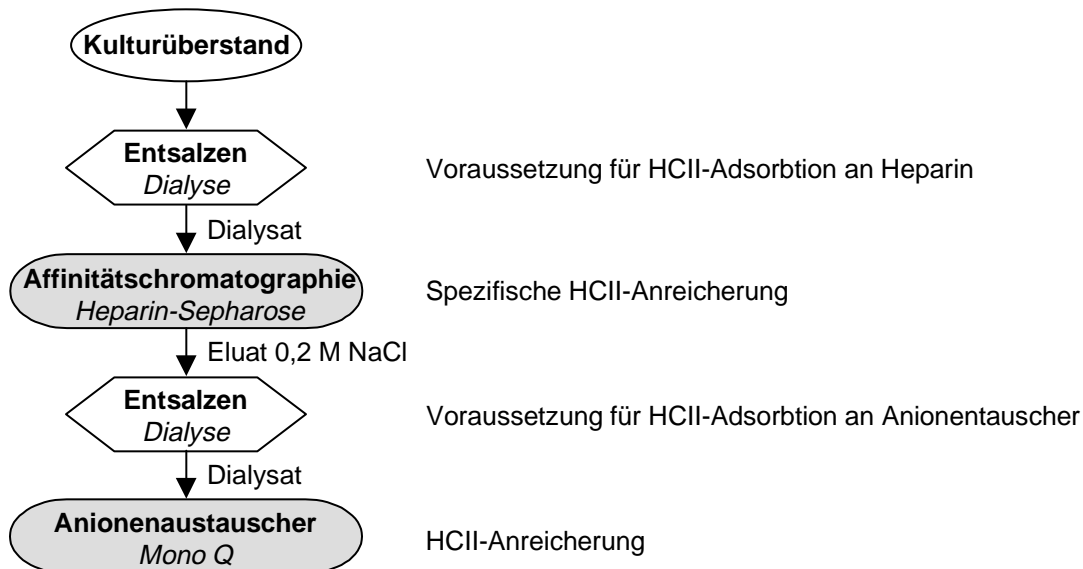


Abb. 17: Reinigungsschema von HCII aus CHO_{HCII}- und HepG2-Kulturüberständen

Die weiteren in Abb. 17 aufgeführten Reinigungsschritte erfolgten wie in Abschnitt II.3.1 beschrieben, wobei jedoch für die Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie folgende Puffer zum Einsatz kamen:

Puffer A: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM NaCl, pH 7,4

Puffer B: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 7,4.

Für die Glykosylierungsanalytik wurde das HCII aus CHO_{HCII}-Zellen an Heparin-Sepharose rechromatographiert (s. Abschnitt III.1.2.3) und mit Superdex 200 HR 10/30 weiter aufgereinigt, wie in Abschnitt II.3.1 beschrieben, um eine höhere Reinheit zu erzielen.

3.3 Reinigung von HCII Δ 51-76 aus *E. coli*

Für die Deletionsmutante HCII Δ 51-76 aus *E. coli* mußten sowohl der Heparin-Sepharose- als auch der Ionenaustauscher-Reinigungsschritt den veränderten physikalischen Eigenschaften des mutierten Proteins angepaßt werden (Abb. 18). Die fehlende saure Domäne ließ eine erheblich festere Bindung an Heparin erwarten, die sich in einer Elution bei entsprechend höherer Ionenstärke niederschlagen sollte.

Während für die Reinigung von HCII aus Plasma, CHO_{HCII}⁻, und HepG2-Überständen ein Anionenaustauscher verwandt wurde, kam für HCII Δ 51-76 ein Kationenaustauscher zum Einsatz. Der Grund hierfür lag in dem wesentlich alkalischerem isoelektrischen Punkt (pI) der Deletionsmutante. Die Nettoladung ist infolge der Deletion der sauren Domäne positiver. Außerdem fehlen die negativ geladenen Sialinsäuren der N-Glykane, deren Synthese in *E. coli* nicht durchgeführt wird. Dadurch steigt der isoelektrische Punkt (pI) von 4,9-5,3 (Plasma-HCII) auf 9,08 bei HCII Δ 51-76.

Letzterer wurde aus der Aminosäuresequenz von HCII Δ 51-76 berechnet (ExPASy-Server, „Compute pI/Mw“, [http:// www.expasy.ch/tools/pi_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)).

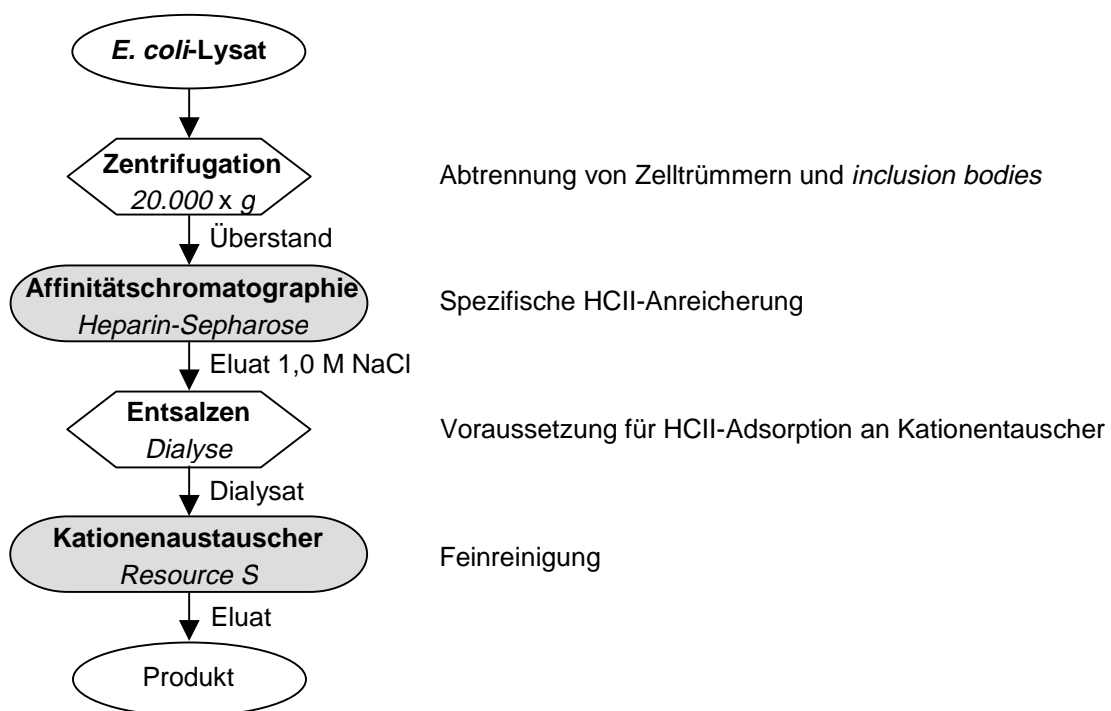


Abb. 18: Reinigungsschema von HCII Δ 51-76 aus *E. coli*

Reinigung von HCIIΔ51-76**- Heparin-Sepharose**

- Säule: - Heparin-HiTrap (5 ml, Pharmacia) für die Reinigung der Schüttelkolbenkultur-Lysate
 - Heparin-Lysin-Sepharose (30 ml, Hoechst) in Pharmacia XK16-Säule für die Reinigung des 5-l-Fermentations-Lysate

Puffer entgasen (Ultraschallbad oder Wasserstrahlpumpe)

Proben (Lysate) zentrifugieren (20.000 x g, 20 min)

Puffer A 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,4

Puffer B 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,4

Fluß 2 ml/min

Equilibrieren 5cv Puffer A (cv = Säulenvolumen)

Auftragen 2 ml/min mit Pumpe A

Waschen 5 cv Puffer A

Eluieren Stufengradient:

0,5 M NaCl, bis UV-Signal wieder bei Null, ca. 3 cv

1,0 M NaCl, bis UV-Signal wieder bei Null

Poolen HCII Fraktionen: UV-Peak bei 1,0 M NaCl-Elution

Fraktionsvol. 5 ml

Reinigen 5 cv TCE, 3 M NaCl

- Quick-Dialyse

- Dialyseschlauch (12-14 kD MWCO, Medicell) 3 x in Milli.-Q auskochen
- Heparin-Sepharose-Eluat einfüllen, verknoten
- gegen 20 mM MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure, Sigma), 0,1 M NaCl, pH 6,0 bei 4 °C für 2 x 1 h je 1 l unter Rühren dialysieren
- evtl. entstandenes weißes Präzipitat abzentrifugieren: 10.000 x g, 10 min

- Resource S

Puffer A: 20 mM MES, pH 6,0

Puffer B: 20 mM MES 1,0 M NaCl, pH 6,0

Fluß: 2 ml/min

Vorbereiten 5 ml Puffer A

10 ml Puffer B

Equilibrieren 5 ml Puffer A

Auftragen mit Pumpe A

Waschen Puffer A

Eluieren 40 ml linearer Gradient 0,1–1,0 M NaCl in 20 mM MES, pH 6,0

Fraktionsvol. 1 ml

Poolen HCII Fraktionen (enthalten ca. 320-380 mM NaCl)

3.4 Konzentrierung von HCII

Zur Konzentrierung von HCII bis zu Probenvolumina von 3,5 ml wurden Zentrifugenkonzentratoren (Microsep 30, Filtron/Pall) eingesetzt. Die Probe wird in das obere Reservoir eingefüllt. Eine Ultrafiltrationsmembran (MMCO 30 kD) hält das zu konzentrierende Protein im Retentat zurück, während das Filtrat, unterstützt durch die Zentrifugalkraft in der Zentrifuge, die Membran passiert. Das Retentat (30 –300 µl) wurde anschließend mit einer Pipette entnommen. Die Zentrifugation fand mit entsprechenden Adaptern in einem SS34-

Festwinkelrotor (RC5-Zentrifuge, Sorvall) bei 5000 x g und 4 °C statt. In ½-h-Abständen wurde der Fortschritt der Filtration kontrolliert, um eine zu starke Konzentrierung und ein Ausfallen der Proteine an der Membran durch Konzentrationspolarisation zu vermeiden.

Für die Aufkonzentrierung des CHO_{HClI}-Überstandes aus der Superspinner-Kultivierung (1 l) kam ein Tangentialstrom-Ultrafiltrations-Modul (Sartocon Micro, MWCO 30 kD, Sartorius) in Verbindung mit einer Pumpe (Typ 5003 U, Watson-Marlow) zum Einsatz.

Ultrafiltration mit Sartocon Micro 30 kD (Sartorius)

Probe:	1 l Superspinner Kulturüberstand
Filtration:	Konzentratausgang mit Schlauchklemme drosseln, um Transmembrandruck (maximal 2 bar) aufzubauen. Von 1 l auf 0,3 l konzentrieren (ca. 4 h), Konzentrat auf Eis kühlen
Reinigung des Moduls:	je 50 ml filtrieren: Milli-Q, 0,5 M NaOH, 1 M HCl, Milli-Q

4 In-situ-Fluoreszenz-Nachweis von HCII

Ziel der *in-situ*-Fluoreszenzanalysen war es, eine HCII-Bindung an die Glykosaminoglykane (GAGs) der extrazellulären Matrix (ECM) nachzuweisen. Um die Immunfluoreszenzmethode zu etablieren, wurden Heparin-Sepharose-Partikel als Modell für die ECM verwendet.

4.1 Fluoreszenz-Methoden

Die Immunfluoreszenz-Technik bedient sich der Empfindlichkeit der Fluoreszenzmikroskopie (Farbstoffverdünnung bis 1:1.000.000) in Verbindung mit der hohen Spezifität immunologischer Verfahren. Benötigt werden dafür Antikörper, die kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) konjugiert sind (Storch 1997, Coons *et al.* 1941). Man unterscheidet die direkte Methode, bei der das Antikörper-Fluorochrom-Konjugat direkt an das Antigen bindet (Abb. 19 b) und die indirekte Methode (Wheatley & Wang 1998), bei der zunächst die Bindung eines Primärantikörpers an das Antigen erfolgt. Den eigentlichen Nachweis ermöglicht dann der fluorochrommarkierte Sekundärantikörper mit Spezifität gegen den Primärantikörper (Abb. 19 c). Neben diesen immunologischen Methoden ist es auch möglich, das gereinigte Protein direkt mit dem Farbstoff kovalent zu markieren (Abb. 19 a). So können die Nachteile des immunologischen Nachweises (unspezifische Färbung, Kreuzreaktionen) vermieden werden, möglicherweise jedoch auf Kosten der Empfindlichkeit.

Darüber hinaus lassen sich bestimmte Strukturen wie z. B. DNA durch Anfärben mit selektiv bindenden Fluoreszenzfarbstoffen gezielt sichtbar machen.

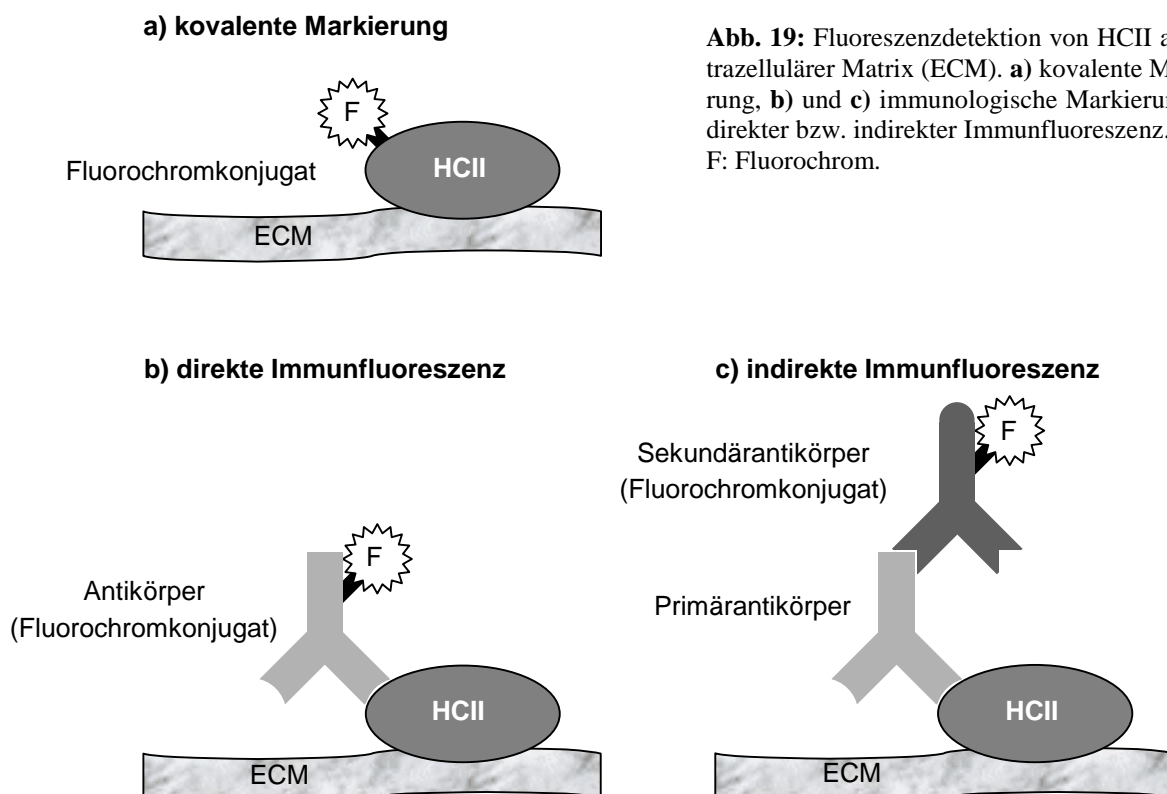


Abb. 19: Fluoreszenzdetektion von HCII auf extrazellulärer Matrix (ECM). **a)** kovalente Markierung, **b)** und **c)** immunologische Markierung mit direkter bzw. indirekter Immunfluoreszenz. F: Fluorochrom.

4.1.1 Kovalente Kopplung von Fluoresceinisothiocyanat an HCII

Für die Fluoreszenzmarkierung von HCII wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet. FITC hat eine gelbgrüne Fluoreszenzfarbe bei einem Emissionsmaximum von $\lambda = 519$ nm und ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 490$ nm. Die Kopplung erfolgt an freie Aminogruppen (Abb. 20). Zunächst wurde im alkalischen Milieu die Kopplung vorgenommen und danach überschüssiger Farbstoff durch Gelfiltration abgetrennt (Storch 1997, Praktikums-Skript Biochemie 1997). Bei einer Ausschlußgrenze von 3.000 kD von Sephadex G-25 eluieren Makromoleküle von der PD-10-Säule (Pharmacia) bei 2,5 ml (Ausschlußvolumen V_0), während niedermolekulare Substanzen um V_t (s. Abschnitt II.3.1.4) bei etwa 9 ml eluieren. Damit ließ sich das FITC von dem Protein-FITC-Konjugat abtrennen. Die Säule wurde über einem UV-Leuchttisch (Transilluminator 312 nm, Biometra) aufgebaut, um das Auffinden der reinsten FITC-HCII-Konjugat-Fractionen während der Elution zu ermöglichen. Eine Bestimmung des Farbstoff/Protein-Verhältnisses wurde nicht durchgeführt. Neben HCII wurde zu Kontrollzwecken auch BSA mit FITC konjugiert.

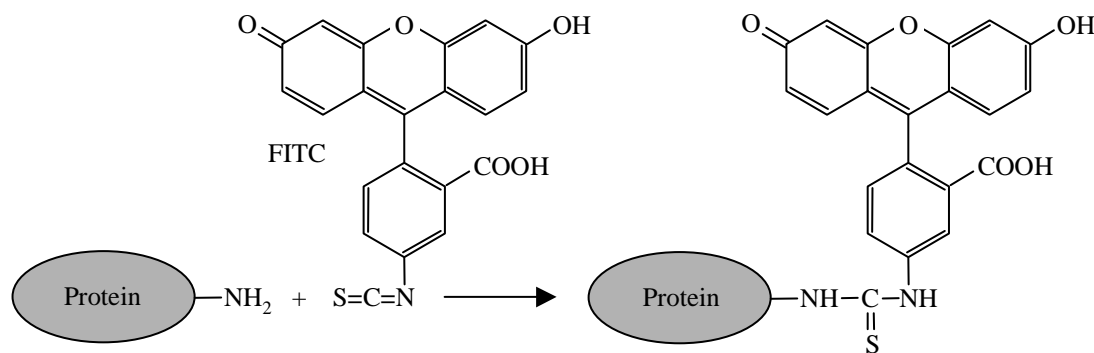


Abb. 20: Kopplung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an Proteine. NH_2 : freie Aminogruppen (N-Terminus, Arginin, Lysin).

FITC-Kopplung an HCII

Lösungen

- 0,2 M NaHCO_3 , 0,15 M NaCl , pH 8,8
- 10 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0
- FITC (2 mg/ml): Fluoresceinisothiocyanat, Isomer I (F7250, Sigma) gelöst in DMSO *FITC erst kurz vor dem Versuch lösen*

Durchführung

1. Kopplungsansatz
 - FITC (MW 389 D) und HCII (MW 65,6 kD) im molaren Verhältnis 20:1 mischen:
0,2 ml HCII (2 mg/ml) = 0,4 mg = 6,1 nmol
122 nmol FITC = 0,047 mg = 23,5 μl FITC in DMSO (2 mg/ml)
 - 0,2 ml 0,2 M NaHCO_3 , 0,15 NaCl , pH 8,8 zugeben
 - 30 min bei RT im Dunkeln inkubieren
2. Gelfiltration mit Sephadex G-25 Fertigsäule (PD-10, Pharmacia)

Equilibrieren	20 ml 10 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0
Probe auftragen	Kopplungsansatz
Elution	10 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0, Fraktionen von ca. 0,5 ml auffangen. UV-Lichtkontrolle (UV-Leuchttisch, <i>UV-Schutzbrille tragen!</i>). FITC-HCII eluiert bei 2,5 ml.

4.2 DAPI-Färbung

Für die Beurteilung der ECM-Präparation wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) eingesetzt, um DNA-Reste nachzuweisen. DAPI bindet bevorzugt an AT-Cluster in der kleinen Furche von doppelsträngiger DNA (Kubista *et al.* 1987). RNA wird weniger intensiv angefärbt. Die RNA-Färbung geschieht durch Interkalation in AU-reichen Regionen (Tanious *et al.* 1992, Kapuscinski 1990). Die Durchführung der DAPI-Färbung ist in Abschnitt II.1.6 beschrieben.

4.3 Mowiol-Einbettung

Fluoreszenzfarbstoffe bleichen im Licht aus, und zwar besonders schnell durch das Anregungslicht der Mikroskopbeleuchtung. Spezielle Einbettungsmittel wie Mowiol verzögern diesen Effekt (Longin *et al.* 1993). Auf den Objektträger mit dem getrockneten Präparat wurde ein Tropfen Mowiol-Lösung gegeben und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt.

Mowiol-Lösung

- 12 g Mowiol (Hoechst)
- 30 g Glycerin zugeben
- 30 ml Milli-Q zugeben
- 2 h rühren
- 12 ml 2 M Tris-HCl, pH 8,5 zugeben
- 10 min bei 56 °C rühren
- 20 min bei 5000 x g zentrifugieren
- Aliquots bei -20 °C lagern

4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Das verwendete Fluoreszenzmikroskop arbeitete nach dem Prinzip der Auflichtmikroskopie, bei der das Anregungslicht mit einem Farbteilerspigel durch das Objektiv geleitet wird. Das Mikroskop (Axioskop, Zeiss) war mit folgenden Filtersätzen (Zeiss) für DAPI und FITC/DTAF ausgestattet.

DAPI: UV-H 365 Nr. 487901 BP365/12 FT 395 LP 397

FITC/DTAF: H395-440 Nr. 487909 BP 450-490 FT 510 LP 520

Für die Aufnahmen mit der Kamera (M35W/MC63A, Zeiss) wurde das 10x- bzw. 40x-Objektiv und ein empfindlicher Farb-Diafilm (Ektachrome Elite II 400, Kodak) verwendet.

4.5 HCII-Nachweis auf Heparin-Sepharose-Partikeln (DASS-Methode)

Um definierte Bedingungen für die Immunfluoreszenz zu gewährleisten, kann der nachzuweisende Ligand kovalent an inerte Träger-Matrix-Partikel gekoppelt werden, wobei u. a. Agaro-

se- bzw. Sepharose-Partikel zum Einsatz kommen. Dies wird als DASS-(*defined antigenic substrate spheres*)-Methode bezeichnet (Van Dalen *et al.* 1973, Capel 1975). Der Ligand für HCII sollte ein GAG sein. Da HCII an Heparin fester als z.B. an Dermatansulfat bindet, eignete sich die kommerziell erhältliche Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia) für diesen Zweck, so daß eine gut charakterisierte Matrix (s. Tab. 7, Abschnitt II.3.1.2) zur Verfügung stand. Mit dieser Methode wurden die Bedingungen für die Immunfluoreszenz etabliert sowie die NaCl-Abhängigkeit der Heparin-HCII-Bindung (mit FITC-HCII) und die Spezifität der Bindung durch Heparinkompetition *in situ* untersucht.

DASS-Methode mit Heparin-Sepharose CL-6B

Lösungen

PB:	20 mM Na-Phosphatpuffer (PB-Puffer), pH 7,4
Primärantikörper:	188/2/1, monoklonal aus gefälltem Maus-Ascites (Hoechst)
Sekundärantikörper:	DTAF-konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG(H+L) (115-015-062, Dianova/Jackson Immuno Research) in 1,2 ml Milli-Q.

Durchführung

Die Versuche erfolgten mit jeweils 30 µl Heparin-Sepharose CL-6B in 1,5 ml Polypropylen-Reaktionsgefäßen bei RT. Zum Wechseln der Lösungen wurden die Heparin-Sepharose-Partikel durch kurzes Zentrifugieren (200 x g, 30 sec) sedimentiert und anschließend der Überstand abpipettiert.

HCII-Nachweis mittels Immunfluoreszenz in NaCl-freiem Puffer

- Heparin-Sepharose-Partikel 4 x 5 min waschen mit PB
- 200 µl HCII (570 µg/ml in PB) zugeben, 3 min inkubieren
- 4 x 5 min waschen mit PB
- 300 µl Primärantikörper (36 µg/ml in PB) zugeben, 30 min bei 37 °C inkubieren
- 4 x 5 min waschen mit PB
- 300 µl Sekundärantikörper (1:50 in PB) zugeben, 30 min bei 37 °C inkubieren
- 4 x 5 min waschen mit PB
- Probe auf Objekträger geben, trocknen, mit Mowiol einbetten

Nachweis von FITC-HCII bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen

- Heparin-Sepharose-Partikel 4 x 5 min waschen mit PB
- je 100 µl HCII (50 µg/ml in PB) zugeben, 30 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- 5 x 5 min waschen mit PB mit jeweils 0,05, 0,10, 0,15 M NaCl
- Probe auf Objekträger geben, trocknen, mit Mowiol einbetten

Nachweis der Spezifität der Heparin-Bindung von FITC-HCII mittels Heparin-Kompetition

- Heparin-Sepharose-Partikel 4 x 5min waschen mit PB
- 100 µl FITC-HCII (100 µg/ml in PB) zugeben, 30 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- 1 x waschen mit PB
- 1ml 0, 0,1, 1,0 mg/ml Heparin (H3393, Sigma) in PB zugeben, 30 min bei RT inkubieren
- 1 x waschen mit PB
- Probe auf Objekträger geben, trocknen, mit Mowiol einbetten

4.6 HCII-Nachweis auf extrazellulärer Matrix

Nach der Anzucht der Zellen auf Zellkultur-Objektträgern wurde die extrazelluläre Matrix (ECM) von Rinderaorta-Endothelzellen (BAEC), Lungenfibroblasten und Lungenepithelzellen freigelegt, um sie für die Fluoreszenz-Bindungsversuche zugänglich zu machen.

4.6.1 Zellkultur in *chamber-slides*

Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen auf speziellen Objektträgern mit 4 oder 8 aufgesetzten und entfernbaren Kulturkammern kultiviert. Diese Kunststoff-*chamber-slides* (Permanox, Nunc) haben eine für die Zellkultur modifizierte Oberfläche und besitzen eine geringe Eigenfluoreszenz. Für BAEC-Zellen erfolgte die Beschichtung der Oberfläche zur besseren Anhaftung mit Fibronectin. Zur Einsaat wurden die Zellen trypsinisiert und 1:3 mit frischem Medium verdünnt (s. Abschnitt II.1.5) in die Kammern gegeben.

Beschichtung von *chamber-slides* mit Fibronectin (FN)

Stammlösung:	1 mg Fibronectin (aus Rinderplasma, 33010-018, Gibco/Life Technologies) in 1 ml sterilem Milli-Q rekonstituieren, ergibt 1 mg/ml FN in 20 mM Phosphatpuffer; pH 6,5 mit Zironensäure eingestellt. In Polypropylengefäße aliquotieren und bei -20 °C lagern.
Beschichtungslösung:	25 µg/ml FN (40x Verdünnung der Stammlösung in PBS)
Beschichtung:	Kulturgefäßoberfläche mit Beschichtungslösung vollständig benetzen. Bei geöffnetem Gefäß in Sterilwerkbank ü. N. eintrocknen lassen. Danach 1 x mit PBS waschen.

4.6.2 Präparation von extrazellulärer Matrix

Die Freilegung der extrazellulären Matrix (ECM) baute auf der Methode von Vlodaysky *et al.* (1980) auf. Durch das nichtionische Detergenz Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) werden alle Membrankomponenten der Zelle solubilisiert und durch nachfolgende Waschschrte entfernt. Zurück bleiben außer der ECM auch viele Zellkerne und damit verbundene Cytoskelett-Reste (Gospodarowicz *et al.* 1980). Durch Inkubation mit 20 – 25 mM NH₄OH lassen sich restliche Zellkerne und Cytoskelett-Bestandteile entfernen (Fridman *et al.* 1985). Zur ECM-Präparation aus Endothelzellen (Bar-Shavit *et al.* 1989) und glatten Muskelzellen (Shirk *et al.* 1996) wurden die Zellen mit einer 0,5 % Triton X-100/20 mM NH₄OH/PBS-Lösung inkubiert (s. auch Abschn. II.4.6.3 und II.4.6.4).

Einschränkend muß gesagt werden, daß sich durch den Einsatz dieser relativ aggressiven Reagenzien das auf der Kulturplatte zurückbleibende ECM-Material präparationsbedingt verändern kann und somit nicht mehr im nativen Zustand vorliegt. ECM-Bestandteile könnten mit gewaschen werden oder auch aufgrund des hohen pH-Wertes der 0,5 % Triton X-100/20 mM NH₄OH-PBS-Lösung denaturiert vorliegen. Daher muß betont werden, daß sich die un-

tersuchte ECM letztlich durch die Präparationsmethode definiert, da sich in Abhängigkeit von dieser unterschiedliche Resultate erzeugen lassen (Burgess *et al.* 1998).

DNase I wurde zusätzlich eingesetzt, um DNA-Reste von den ECM-Präparaten zu entfernen.

ECM-Präparation, Triton X-100 mit/ohne NH₄OH

- Zellen in 8er-*chamber-slide* 2 x mit PBS waschen
- inkubieren mit 300 µl 0,5 % Triton X-100 in PBS, 30 min bei RT
- 4 x mit PBS waschen
- optional: inkubieren mit 300 µl 20 mM NH₄OH in PBS, pH ca. 10, 3 min RT
- 2 x mit PBS waschen

ECM-Präparation mit DNase I

DNase-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 50 µg/ml BSA
DNase I 1 mg/ml (0649, Amresco)

- Zellen 8er-*chamber-slide* 2 x mit PBS waschen
- inkubieren mit 0,5 ml/cm² 0,5 % Triton X-100 in PBS, 15 min RT
- 1 x waschen mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 2 x waschen mit DNase-Puffer
- inkubieren mit 150 µl/cm² DNase I (0,1 mg/ml in DNase-Puffer), 1 h 37 °C
- 3 x waschen mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5
- DAPI-Färbung (s. Abschn. II.4.2), 15 min 37 °C
- 2 x mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 waschen

4.6.3 Immunfluoreszenz-Nachweis von HCIIΔ51-76

Zum immunologischen Nachweis von HCIIΔ51-76 auf der ECM wurde die indirekte Methode mit Primär- und Sekundärantikörpern verwendet. Die Anzucht der Zellen erfolgte auf speziellen Objektträgern (*chamber slides*) wie in Abschnitt II.4.6.1 und die ECM-Präparation wie in Abschnitt II.4.6.2 beschrieben. Die ECM wurde in Gegenwart unterschiedlicher Dermatansulfatkonzentrationen mit HCII inkubiert, um die Spezifität der Bindung nachzuweisen.

Immunfluoreszenz

Primärantikörper: 188/2/1, monoklonal aus gefälltem Maus-Ascites (Hoechst)
Sekundärantikörper: Dichlorotriazinylamino-Fluorescein-(DTAF)-konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG(H+L) (115-015-062, Dianova/Jackson Immuno Research) rekonstituiert in 1,2 ml Milli-Q, Lagerung der Aliquots (50 µl) bei -20 °C.

Präparat: BAEC, konfluent in 4er-chamber-slide

Durchführung

- 2 x mit PBS waschen
- 0,5 % Triton X-100, 20 mM NH₄OH in PBS, 5 min bei RT inkubieren
- 4 x mit PBS waschen
- 200 µl HCIIΔ51-76 (90 µg/ml) mit 0, 0,1 bzw. 1 mg/ml DS in PBS für 30 min bei RT inkubieren
- 4 x mit PBS waschen
- 300 µl Primärantikörper (36 µg/ml) in PBS, 3 % BSA, 30 min bei RT inkubieren
- 4 x mit PBS waschen
- 300 µl Sekundärantikörper (1:50 in PBS, 3 % BSA), 30 min bei RT inkubieren
- 4 x mit PBS waschen
- trocknen, in Mowiol einbetten
- mikroskopieren (s. Abschnitt II.4.4)

4.6.4 In-situ-Nachweis von FITC-HCII auf extrazellulärer Matrix

Das Bindungsverhalten von FITC-HCII an die extrazelluläre Matrix (ECM) wurde bei geringer Ionenstärke in 20 mM Na-Phosphat-Puffer ohne NaCl-Zusatz (PB) durchgeführt, da in Vorversuchen keine Bindung bei physiologischer Ionenstärke in PBS nachzuweisen war. Die ECM-Präparation ist in Abschnitt II.4.6.2 näher beschrieben.

Fluoreszenznachweis von FITC-HCII auf ECM

Präparat: IMR-90-Zellen (13. Passage, konfluent) auf 8er Chamber Slide

Puffer: PBS
 PB 20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,4

Durchführung

- Zellen in 8er-chamber-slide 2 x mit PBS waschen
- 0,5 % Triton X100 in PBS, 15 min RT
- 20 mM NH₄OH in PBS, 2 min RT
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit PB waschen
- 100 µl FITC-HCII (150 µg/ml), 30 min bei RT inkubieren
- 2 x mit PB waschen
- 300 µl DAPI-Lösung (s. Abschn. II.1.6), 15 min RT
- 2 x mit PB waschen

5 Analytik

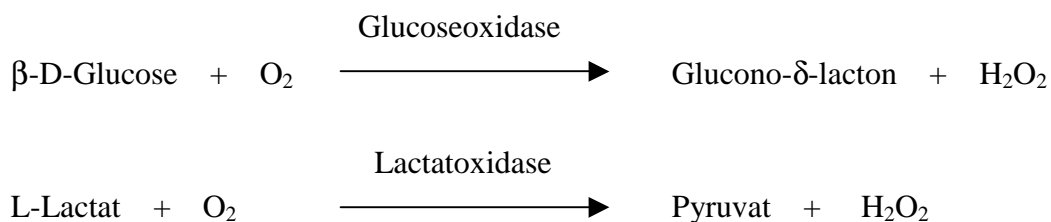
5.1 Medium-Analytik

5.1.1 Aminosäuren-Analytik

Zur Vermeidung von Nährstofflimitierungen ist eine ausreichende Aminosäureversorgung der Zellkultur eine wesentliche Voraussetzung (Eagle 1959). Für die CHO_{HCl}-Kultivierung wurden die Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand mit Hilfe der Umkehrphasen-HPLC nach der OPA-Methode (Büntemeyer *et al.* 1991, Büntemeyer 2000) bestimmt. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Versetzen von 100 µl zellfreiem Kulturüberstand mit 100 µl 5 % Perchlorsäure (Proteinfällungsreagenz) und anschließender Zentrifugation (5 min, 2000 x g). 100 µl des Überstandes wurden dann mit 200 µl 0,4 M Na-Boratpuffer (pH 10,4) alkalisiert und 20 µl davon in ein Probengefäß für die automatische Analyse gegeben. Dort erfolgte die Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol mit ortho-Phtaldialdehyd (OPA) in zyklische fluoreszenzfähige Isoindolderivate. Für die Trennung kam eine automatische HPLC-Anlage (D 450-Mt2, Kontron) mit einer Umkehrphasen-Chromatographiesäule (Ultrasphere ODS, C18, 5 µm Partikelgröße, Beckmann) und einem binären Puffersystem zum Einsatz. Zur Quantifizierung wurden die Peak-Flächen des Fluoreszenzdetektor-Signals (SFM25, Kontron) integriert (Software Kroma 2000, Kontron).

5.1.2 Enzymatische Bestimmung von Glucose und Lactat

Die Glucose- und Lactatkonzentrationen im Kulturüberstand wurden vollautomatisch und gleichzeitig von dem Analysengerät YSI 2700 (Yellow Springs Instruments) bestimmt. Das Meßprinzip beruht auf einer Enzymreaktion, deren Produkt (H₂O₂) an einer Platin-Elektrode oxidiert wird:



Zur Messung wird ein Probenvolumen von 25 µl eingezogen und in eine gerührte Meßkammer überführt, in der sich zwei Meßsonden befinden. Jede Sonde besteht aus drei Membranen. Das Substrat diffundiert zunächst durch eine Polykarbonatmembran und trifft dann auf die Membran mit der immobilisierten Peroxidase. Die dritte Membran aus Celluloseacetat kann nur von niedermolekularen Substanzen wie H₂O₂ passiert werden, welches dann an der Platinanode oxidiert wird. Der entstehende Signalstrom ist der jeweiligen Glucose- bzw. Lactatkonzentration proportional. Die Eichung erfolgt mit Hilfe von Standardlösungen (Yellow Springs Instruments).

5.2 Quantifizierung von HCII

5.2.1 ELISA

Mit Hilfe des Sandwich-ELISA lässt sich auch aus stark verunreinigten Proben das gesuchte Antigen mit hoher Empfindlichkeit quantitativ bestimmen. Das Antigen wird zunächst durch einen immobilisierten Fangantikörper ähnlich einer Affinitätschromatographie angereichert und durch einen zweiten, enzymkonjugierten Detektionsantikörper (Ngo 1988) nachgewiesen (Abb. 21)

Die Kunststoffmatrix einer Mikrotiterplatte wird mit dem Fangantikörper beschichtet, der gegen das Zielprotein HCII gerichtet ist. An diesen Antikörper adheriert das HCII der Probe. Zum Nachweis des HCII wird ein zweiter Antikörper eingesetzt, der wiederum spezifisch an das HCII bindet. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, das eine Farbreaktion ermöglicht. Bei dieser Nachweisreaktion wird durch Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horse radish peroxidase*) das farblose Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) zu einem gelben Diphenochinon-Farbstoff oxidiert (Abb. 22). Der Test basiert auf einer bei der Hoechst AG entwickelten Vorschrift (Hölper 1991) und wird in einer Mikrotiterplatte (Maxisorb F96, Nunc) durchgeführt. Die Messung geschieht in einem automatischen Microplate-Reader (ELx808, Bio-Tek Instruments), der von einem PC mit entsprechender Software (MikroWin V 3.15, Mikrotek Laborsysteme) gesteuert wird. Die Extinktions-Messung erfolgt als Endpunktbestimmung bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm. Als Standard dient Standard-Human-Plasma (ORKL 12, Behring) das 90 µg/ml HCII enthält (Tollefsen *et al.* 1982).

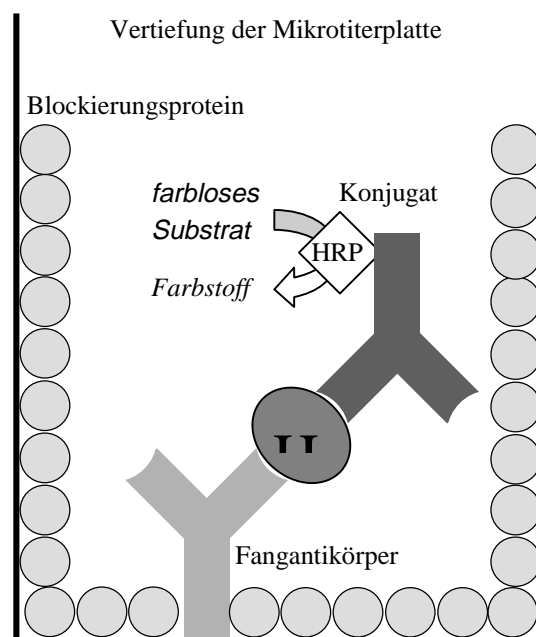


Abb. 21: Prinzip des Sandwich-ELISA zur quantitativen HCII-Bestimmung

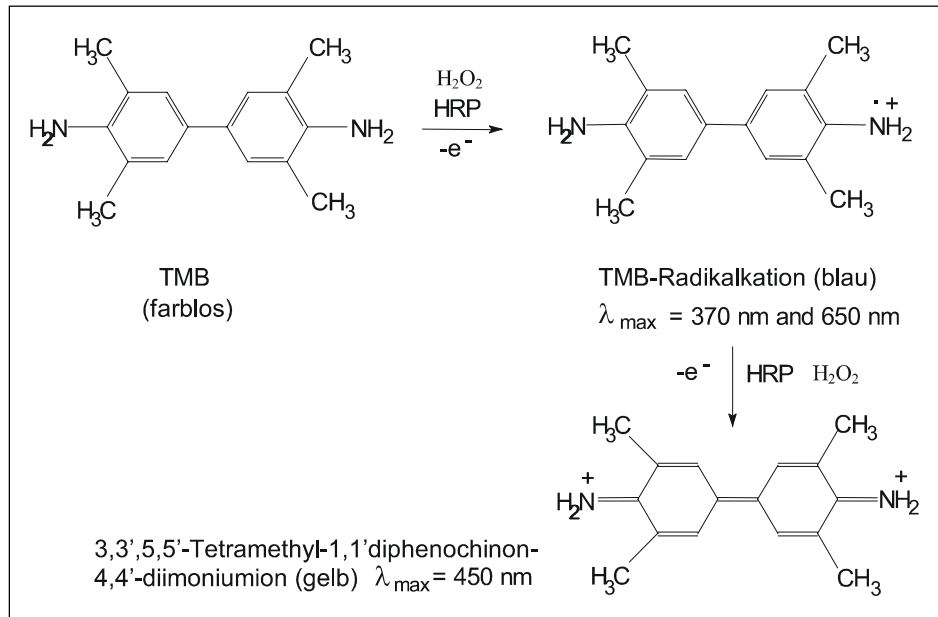


Abb. 22: Farbreaktion von Tetramethylbenzidin (TMB)

HCII-ELISA

- Fangantikörper:** 188/2/1, monoklonaler IgG 2b aus gefälltem Maus-Ascites, 1,8 mg/ml in PBS, 100 μ l Aliquots, -80°C (Hoechst)
- Detektionsantikörper:** 92/2/12, monoklonaler Antikörper IgG1 mit Peroxidase markiert, 1 mg/ml in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,4, -80°C , (Hoechst)

Lösungen:

PBS-Puffer für 1 l

+	NaCl (137 mM)	8,00 g
+	KCl (2,7 mM)	0,20 g
+	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (5,4 mM)	1,44 g
+	KH_2PO_4 (1,8 mM)	0,24 g
-	pH 7,4 einstellen	

MSTB-Puffer für 0,1 l

+	0,2% (v/v) Triton X-100	0,20 g
+	0,1 M MOPS	2,09 g
+	0,2% (w/v) SDS	0,20 g
+	2,5% (w/v) BSA	2,50 g
-	pH 7,4 mit 1 N NaOH einstellen	

Waschpuffer

-	10 mM NaH_2PO_4
-	75 mM NaCl
-	0,05 % (v/v) Tween 20
-	pH 7,4

TMB-Chromogen-Lösung: TMB Microwell Peroxidase System (Kirkegaard & Perry, Dunn)

HCII-ELISA (Fortsetzung)**Durchführung**

(auf Mikrotiterplatte (Maxisorp F96, Nunc))

- Beschichtung: 100 µl Fangantikörper (1:100 verdünnt in PBS), ü. N. bei 4 °C oder 30 min bei 37 °C inkubieren.
- Blockieren: 200 µl BSA-Lösung (0,2 g in 20 ml Waschpuffer), 30 min 37 °C
- Waschen: 3 x mit 200 µl Waschpuffer
- Standard und Proben auftragen
 - Standard-Verdünnungsreihe: 3, 1, 0,33, 0,11, 0,037 und 0,012 µg/ml.
 - Standard-Human-Plasma 1: 10 mit MSTB verdünnen:
 - 890 µl MSTB-Puffer
 - + 10 µl Heparin, 2500 IE/ml (H-3393, Sigma)
 - + 100 µl Standardplasma (ORKL 12, Behring)
 - 1:10 Verdünnung 6 mal jeweils 1:3 mit MSTB-Puffer weiter verdünnen
 - Probenvorbereitung: Die Probenverdünnung geschieht mit MSTB-Puffer, dem Heparin ad 25 IE/ml (Endkonzentration) zugesetzt wird.
 - Auftragen: je 100 µl Probe, Standard oder Blank (MSTB-Puffer)
Proben auf der Mikrotiterplatte 1:2 mit 12-Kanal-Pipette verdünnen
 - Inkubieren: 90 min, 37 °C
- Waschen: s.o.
- Detektionsantikörper: 100 µl Detektionsantikörper (1:1000 verdünnt in PBS mit 10 % FCS), 90 min inkubieren bei 37 °C
- Waschen: s.o.
- Substrat: 100 µl TMB-Chromogen-Lösung, 30-45 min inkubieren bei RT
- Stoppen: 150 µl Stopplösung (0,5 N H₂SO₄)

5.2.2 BCA

Zur quantitativen Proteinbestimmung der gereinigten HCII-Fractionen kam neben der A₂₈₀-Methode (s. u.) der BCA-Test (Smith *et al.* 1985) zum Einsatz. Der BCA-Test macht sich wie der Lowry-Test die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ im alkalischen Milieu bei Anwesenheit von Proteinen zunutze. Cu⁺ bildet dann mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen farbigen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Der Test wurde mit einem BSA-Standard nach dem Standard-Protokoll (Instructions, Pierce 1993) des BCA-Assay (Pierce) auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt.

5.2.3 Absorptionsmessung bei 280 nm

Proteine besitzen 2 Absorptionsmaxima im UV-Bereich. Bei einer Wellenlänge um 205 nm absorbieren die Peptidbindungen. Bei 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie, deutlich schwächer, Phenylalanin (Stoscheck 1990). Aufgrund der starken Abhängigkeit der UV₂₈₀-Absorption von der Aminosäurezusammensetzung eines Proteins muß für jedes Protein der Absorptionskoeffizient aus der Aminosäuresequenz

berechnet oder experimentell ermittelt werden. Der Absorptionskoeffizient für HCII ($0,593 \text{ ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde von Church *et al.* (1987) bestimmt. Damit ergibt sich die HCII-Konzentration einer reinen Lösung aus der Extinktion bei 280 nm (A_{280}) und bei 1 cm Schichtdicke wie folgt:

$$\text{HCII [mg/ml]} = A_{280} / 0,593 \text{ ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1} / 1 \text{ cm}$$

Zur Extinktionsmessung wurden Halbmikro-Quarzküvetten (Hellma) und ein Zweistrahlphotonometer (Shimadzu 1602 PC) verwendet.

5.3 Biologische Aktivität von HCII

5.3.1 Kinetik der Thrombinhemmung durch HCII

Die irreversible Inhibition von Thrombin (T) durch HCII entspricht einer Reaktion zweiter Ordnung,



und läßt sich durch das Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung beschreiben:

$$-d[\text{T}]/dt = k_2 [\text{T}][\text{HCII}] \quad (7)$$

Bei einem großen Überschuß eines Reaktanden (z. B. HCII) vereinfacht sich dies zu einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung, da die Konzentration von HCII als konstant angenommen werden kann:

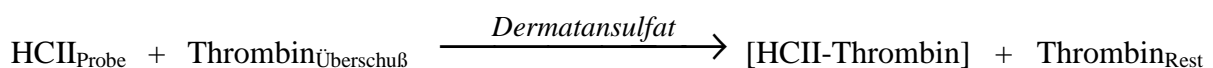
$$-d [\text{T}]/dt = k [\text{HCII}]_{\text{konst.}}[\text{T}] \quad (8)$$

bzw. in integrierter Form: $k' t = \ln ([\text{T}]_0/[\text{T}]_t)$ (9)

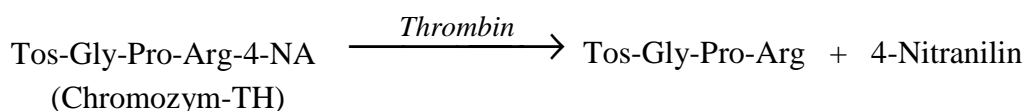
mit $k_2 = k'/[\text{HCII}]_{\text{konst.}}$ (10)

Bei einer Auftragung von $\ln([\text{T}]_0/[\text{T}]_t)$ gegen t ergibt die Steigung k' . Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_2 berechnet sich dann aus dem Quotienten von k' und der eingesetzten HCII-Konzentration.

Die Durchführung des Thrombininhibitionstests beruht auf der Beschreibung von Derechin und Blinder (Derechin *et al.* 1990, Blinder & Tollefsen 1990). In Gegenwart von Dermatansulfat wird HCII in einen aktiveren Thrombin-Inhibitor überführt



Das nicht inhibierte $\text{Thrombin}_{\text{Rest}}$ spaltet das synthetische Substrat Chromozym-TH, dessen Spaltprodukt (4-Nitranilin) photometrisch bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ quantifiziert wird.



Der für die Messungen eingesetzte TS-PEG-Komplexierungspuffer enthielt PEG, um Adsorptionseffekte an den Gefäßwänden zu verringern. Die Reaktion erfolgte in Kunststoffgefäßen. Kontakt mit Glas wurde vermieden, da Thrombin an Glasoberflächen adheriert. Die Komplezierungsreaktion wurde durch die Substratzugabe (Chromozym TH) kompetitiv gehemmt und dadurch gestoppt. Die Reaktionsgeschwindigkeit, gemessen als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta A/\text{min}$), war proportional zur Thrombinkonzentration.

Thrombin-Hemmtest

Reagenzien	humanes Plasma-Thrombin, 2980 NIH units/mg, (T-6759, Sigma) humanes Plasma-HCII (250 nM) Chromozym TH (206849, Boehringer Mannheim) Dermatansulfat (C-3788, Sigma) PEG 8000 (Sigma)
Lösungen	TS/PEG: 0,02 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1 g/l PEG 8000, pH 7,4 Substrat: 200 μM Chromozym TH (M_r 662,62) in TS/PEG, Aliquots (10 ml) bei -20°C lagern Thrombin: 2 U/ml (18,34 nM) in TS/PEG Dermatansulfat: 1 bzw. 0,1 mg/ml in TS/PEG

photometrische Messung der Thrombinreaktion

kinetisch ($\Delta A/\text{min}$) bei 405 nm im Zweistrahlphotometer (Typ 1602 PC, Software UV1620 V.3.5, Shimadzu) gegen H_2O im Referenzstrahlengang.

Effekt der Dermatansulfatkonzentration auf die Thrombinhemmung durch HCII

- Durchführung bei 25°C im Eppendorf-Thermostat
- Pipettierschema:
 - + 10 μl DS-Lösung (0 - 1 mg/ml) in Küvette vorlegen
 - + 40 μl HCII (250 nM), gut mischen
 - + 50 μl Thrombin (18,34 nM), gut mischen
 - exakt 1 min inkubieren
 - + 500 μl Substrat-Lösung, gut mischen, $\Delta A/\text{min}$ bestimmen

Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k

- Durchführung bei 25°C im Eppendorf-Thermostat
- Pipettierschema:
 - ohne Dermatansulfat**
 - 100 μl TS/PEG
 - + 400 μl HCII (250 nM)
 - + 500 μl Thrombin (18,34 nM)
 - vortexen, bei 25°C inkubieren, Uhr starten
 - 2 h alle 15 min je 100 μl in Küvette überführen, 500 μl Chromozym-TH zugeben und $\Delta A/\text{min}$ bestimmen.
 - mit 10 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dermatansulfat**
 - 40 μl HCII (250 nM) in Küvette vorlegen
 - + 50 μl Thrombin (18,34 nM), gut mischen
 - + 10 μl DS-Lösung (0,1 bzw. 1 mg/ml) in Halbmikroküvette (Start der Reaktion), kurz mischen
 - sofort 500 μl Substrat-Lösung zugeben
 - Die Reaktionszeit liegt im Sekundenbereich und sollte von zweiter Person mit einer Stoppuhr möglichst exakt gemessen werden.
 - $\Delta A/\text{min}$ bestimmen

Thrombin-Hemmtest (Fortsetzung)

Für den Quotienten $[T]_0/[T]_t$ brauchen die Thrombinkonzentrationen $[T]_0$ und $[T]_t$ nicht berechnet zu werden. Da $\Delta A/\text{min}$ proportional zur Thrombinkonzentration $[T]_0$ bzw. $[T]_t$ ist, wird statt dessen der Quotient der entsprechenden $\Delta A/\text{min}$ -Werte gebildet.

Thrombinhemmtest von Kulturüberständen

- Durchführung bei 25 °C im Eppendorf-Thermostat
- Pipettierschema:
 - + 10 μl DS-Lösung (1 mg/ml) in Halbmikroküvette vorlegen
 - + 40 μl Kulturüberstand (evtl. in TS-PEG vorverdünnt)
 - + 50 μl Thrombin-Lösung (18,34 nM), gut mischen
 - 1 min inkubieren
 - 500 μl Substrat-Lösung zugeben, $\Delta A/\text{min}$ bestimmen

5.3.2 Komplexierung von HCII und Antithrombin mit Thrombin

HCII bildet ebenso wie Antithrombin (AT) mit Thrombin SDS-stabile, kovalente 1:1-Komplexe (Tollefsen & Blank 1981). Die Komplexbildung erfolgt in Gegenwart von GAGs erheblich schneller (s. Abschn. I.3.4), läuft jedoch auch ohne sie ab. Für die Tests auf biologische Aktivität von HCII aus Plasma, CHO- und HepG2-Zellen wurde HCII mit Thrombin in Gegenwart von Dermatansulfat inkubiert und der Komplexierungsansatz mittels Western-Blot untersucht.

Für die Fraktionierung von HCII/Thrombin bzw. AT/Thrombin an Heparin-Sepharose (siehe Abschnitt III.3) erfolgte die Komplexbildung ohne GAG-Beteiligung, da nicht immobilisiertes Heparin (oder Dermatansulfat) mit dem Säulenmaterial um die GAG-Bindungsstellen der Proteine konkurrieren würde. Unkomplexiertes Thrombin wurde vor dem Auftragen auf die Heparin-Sepharose-Säule mit PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) irreversibel inhibiert, um eine GAG-katalysierte weitere Komplexbildung durch das Säulenmaterial auszuschließen. Die Komplexierungsansätze enthielten jeweils equimolare Mengen von Thrombin und Serpin und hatten jeweils ein Volumen von ca. 200 μl . Bei einem molaren Überschuss von Thrombin war eine größere elektrophoretische Mobilität von Inhibitor und Komplex zu beobachten – vermutlich wegen der Proteasetätigkeit des nicht inhibierten aktiven Thrombins. Die Komplexierungsansätze wurden für die Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie mittels Dialyse (MWCO 12-14 kD, Medicell) gegen 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4 (1 h, 4 °C) entsalzt.

Zur Konzentrationsbestimmung des biologisch aktiven HCII aus Plasma und CHO-Kulturüberständen (s. Abschnitt III.1.2.4) wurden 40 μl Probe (Kulturüberstand), 50 μl Thrombin (in TS-PEG, 20 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1 g/l PEG, pH 7,4) und 10 μl Dermatansulfat (in TS-PEG) gemischt und 1 min inkubiert. In diesem Ansatz betrug die Endkonzentration von Thrombin 9,17 nM und von Dermatansulfat 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nach Zugabe von 500 μl Chromozym TH (200 μM in TS-PEG) wurde die Rest-Thrombinaktivität photometrisch als Absorptionsänderung ($\Delta A_R/\text{min}$) bestimmt (s. Abschn. II.5.3.1). Unter der Annahme,

daß das eingesetzte Thrombin zu 100 % aktiv ist, ergibt sich die Konzentration des aktiven HCII wie folgt:

$$(\Delta A_0/\text{min} - \Delta A_R/\text{min}) / \Delta A_0/\text{min} \times 9,17 \text{ nM}$$

Die Basis-Aktivität des ungehemmten Thrombins ($\Delta A_0/\text{min}$) wurde ohne Zusatz von Inhibitor ermittelt.

T-HCII-Komplexierung mit Dermatan sulfat:	Thrombin (T6759, Sigma) und HCII (je 40 nM) in TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) mit 100 µg/ml Dermatan sulfat (C-3788, Sigma) 10 min bei RT inkubieren. Reaktionsvolumen 200 µl.
T-HCII-Komplexierung ohne GAGs:	Je 0,6 µM Thrombin (T6759, Sigma) und HCII in 270 µl TSP (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 g/l PEG, pH 7,4) für 2 h bei 37 °C inkubieren. Danach restliches Thrombin mit 2 mM PMSF (Endkonzentration) inhibieren.
T-AT-Komplexierung ohne GAGs:	Je 1,2 µM Thrombin (T1063, Sigma) und AT (602434, Boehringer Mannheim) in 250 µl 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 für 10 min bei 37 °C inkubieren. Danach restliches Thrombin mit 2 mM PMSF inhibieren. - Angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen -

5.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine nach ihrer Größe. Die Polypeptidketten werden dazu mit dem anionischen Detergenz SDS entfaltet und bilden ellipsoide Mischmicellen mit negativer Ladung, die im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die SDS-Beladung der Polypeptidketten erfolgt in einem konstanten Massenverhältnis von 1,4 g SDS pro g Protein. Die Trennung geschieht nach ihrem Stokes-Radius durch einen Molekularsiebeffekt im porösen Gel (Lottspeich & Zorbas 1998). Man erhält eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molmasse und der relativen Wanderungstrecke im Gel. Disulfidbrücken müssen zusätzlich durch Reduktionsmittel wie 2-Mercaptoethanol gespalten werden. Um schärfere Banden zu erzielen und um Ausfällungen beim Eintritt der Proteine ins Trenngel zu vermeiden, benutzt man diskontinuierliche Gele mit einem grobporigen Sammelgel und feinporigen Trenngel. Zusätzlich sollte das Sammelgel einen niedrigeren pH-Wert (6,8) als das Trenngel (8,8) aufweisen, wenn das Tris/Glycin-Puffersystem verwendet wird (Laemmli 1970). Dies erlaubt eine Trennung und Fokussierung der Proteine im Sammelgel nach dem Prinzip der Isotachophorese.

Die Probenvorbereitung geschah durch 1:2-Verdünnung in reduzierendem Probenpuffer und Denaturierung für 4 min bei 95 °C. Der LMW-Marker wurde im gleichen Probenpuffer rekonstituiert und denaturiert. Die Trennung erfolgte in 1 mm starken 10%igen Tris/Glycin-Fertiggelen (Novex) nach Herstellervorschrift (Novex 1997) in der entsprechenden Elektrophoresekammer (Xcell II Mini-Cell, Novex) für 90 min bei einer konstanten Spannung von 150 V (Netzgerät PS 3002, Gibco).

Die SDS-PAGE in Abb. 25 (Abschn. III.1.1) wurde mit einem 10%igen Gel in der Protean II xi Elektrophoresekammer (Biorad) nach Herstellervorschrift durchgeführt.

<u>SDS-PAGE</u>	
Markerproteine	<i>Low molecular weight marker</i> (LMW, Pharmacia): Phosphorylase b (94 kD), Albumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Carboanhydrase (30 kD), Trypsin Inhibitor (20,1 kD), α -Lactalbumin (14,4 kD)
Lösungen	Laufpuffer 10fach konzentriert (10 x LP): 0,25 M Tris-Base 1,92 M Glycin 1 % SDS pH-Wert nicht einstellen, 1 x Laufpuffer pH ca. 8,3 reduzierender, zweifach konzentrierter Probenpuffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 2,5 ml 10 % SDS 4,0 ml 0,1 % Bromphenol-Blau 0,5 ml Glycerin 2,0 ml 2-Mercaptoethanol 0,5 ml auf 10 ml mit Milli-Q auffüllen, 2 ml Aliquots bei -20 °C lagern

5.4.1 Coomassie-Blau-Färbung

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie-Blau nach der SensiQuant-Methode (Bülles *et al.* 1990) für 20 min bei 50 °C im Schüttler-Wasserbad. Das Entfärben erfolgte anschließend bei 50 °C mit mehrmaligem Entfärberwechsel für 1-2 h. Vor dem Trocknen wurde das Gel zunächst in 10 % Essigsäure, 10 % Glycerin equilibriert und danach zwischen zwei Lagen Einmachfolie (Dr. Oetker) mit einem Gelrockner (Modell 583, BioRad) für 45 min bei 75 °C unter Vakuum getrocknet.

<u>Coomassie-Blau-Färbung</u>	
Färbelösung:	1 Tablette Coomassie-Blau R-350 (Pharmacia) 50 ml Essigsäure 100 ml Isopropanol 150 ml Milli-Q
Entfärber:	200 ml Isopropanol 100 ml Essigsäure 700 ml Milli-Q

5.4.2 Gel-Auswertung

Für die Bestimmung der apparenten Molekularmassen und der isoelektrischen Punkte (2D-Gele) anhand der Markerproteine sowie für die densitometrische Auswertung wurde eine A-

nalyse-Software (WinCam V2.2, Cybertec) verwendet. Die dafür benötigten Bild-Dateien (TIF-Format) wurden mit einem Flachbett-Scanner (Scanjet 4c, Hewlett-Packard) erzeugt. Dessen Software stellte eine Helligkeits- und Kontrast-Automatik zu Verfügung, die eine vorlagentreue Abbildung für die Dokumentation gewährleistete.

5.5 Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens wird das Bandenmuster elektrophoretisch aufgetrennter Proteine von dem Trenngel auf eine inerte Filter-Membran übertragen und – im Fall des Immuno-Blots – mittels Antikörper spezifisch angefärbt. Der Protein-Transfer kann durch Konvektion, Diffusion oder im elektrischen Feld erreicht werden. Beim Elektroblot wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld aus dem Gel heraus in Richtung Anode und adherieren an der Blotmembran (Towbin *et al.* 1979).

5.5.1 Elektrotransfer

Der Transfer im elektrischen Feld von Mini-Gelen (Novex) wurde mit dem Semi-Wet-Blot-Modul (Novex) durchgeführt, während der Blot der ca. 15 x 20 cm großen Gele der 2D-Elektrophorese (siehe Abschnitt II.5.6) mit einer Tank-Elektroblot-Vorrichtung (BioRad) erfolgte.

Blot der Mini-Gele (ca. 7 x 8 cm)

Das Gel wurde zusammen mit der in Transferpuffer äquilibrierten Blotmembran (PVDF Hybond, Amersham) luftblasenfrei zwischen zwei Blotpapieren (GB004, Schleicher & Schüll) und je zwei Lagen Fasermatten in die Transferkammer (Xcell II Blot Module, Novex) eingesetzt, die dann mit Transferpuffer befüllt wurde (Novex-Instructions 1998).

Bei einer konstanten Spannung von 25 V (Netzgerät 200/2.0, BioRad) und RT betrug die Transferzeit für HCII 90 min.

Transferpuffer (Novex)

Tris-Base (12 mM), Glycin (96 mM), Methanol (20%), pH ca. 8,3
pH nicht einstellen

Blot der 2D-Gele (ca. 15 x 20 cm)

Das auf 15 x 20 cm gestutzte Gel wurde mit der in Transferpuffer äquilibrierten Membran (PVDF Hybond, Amersham) nach Hersteller-Vorschrift (Instruction Manual, BioRad) zwischen 2 Blotpapieren (GB002, Schleicher & Schüll) und zwei Fasermatten im Gelhalter fixiert und in den mit 4 °C kaltem Towbin-Transfer-Puffer gefüllten Blot-Tank gegeben. Die Kühlschlange des Blot-Tanks war mit einem Kühlthermostaten (Typ F10, Julabo) verbunden. Ein Magnetrührer erlaubte mittels Magnetrührkern eine Umwälzung des Transferpuffers im Blot-

Tank. Bei 4 °C betrug die Transferzeit zunächst 24 h bei 15 V konstanter Spannung und anschließend 1 h bei 50 V konstanter Spannung.

Towbin-Transferpuffer

Tris-Base (25 mM), Glycin (192 mM), Methanol (20 %), pH ca. 8,3
pH nicht einstellen

5.5.2 Immundetektion von geblotteten Proteinen

Zur Identifizierung eines Proteins in dem geblotteten Bandenmuster wird das gesuchte Protein durch spezifisches Binden eines markierten Liganden (z.B. Antikörper) erkannt. Die Position kann dann mittels eines Enzyms sichtbar gemacht werden, das einen Farbstoff freisetzt oder wie beim ECL-System eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert (Abb. 23).

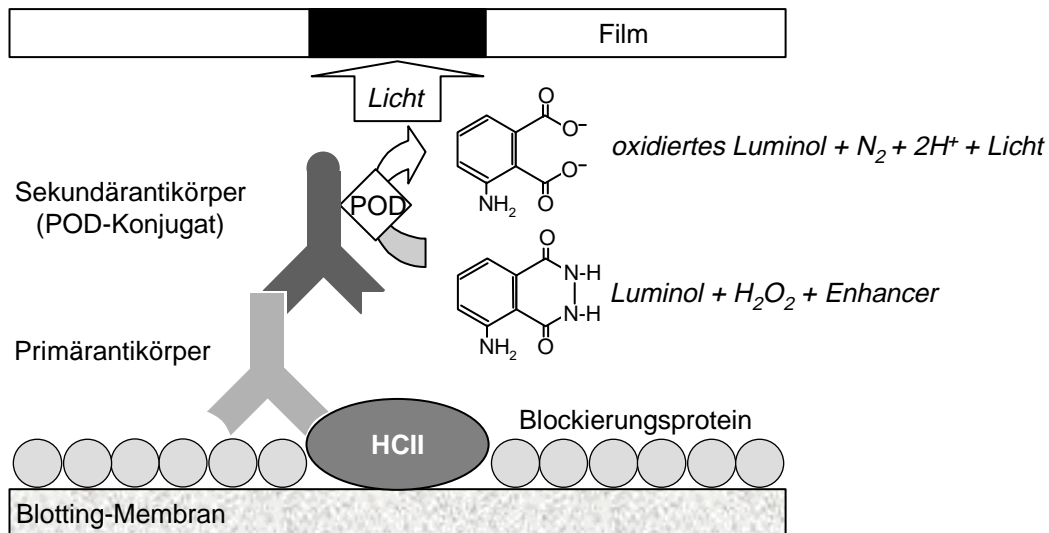


Abb. 23: Schema der Immundetektion auf der Western-Blot-Membran. Als Primärantikörper wird ein polyklonales, für HCII spezifisches Kaninchenserum eingesetzt. Der Sekundärantikörper ist gegen Kaninchen-IgG gerichtet und mit Peroxidase (POD) konjugiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazidion) zu 5-Aminophtalsäure durch H_2O_2 . Die freiwerdende Energie wird in Form von Licht abgegeben, wobei die Stärke und Dauer der Lichtemission durch die Beteiligung von chemischen Enhancern (z.B. Phenole) deutlich gesteigert wird (Enhanced Chemiluminescence, ECL, Amersham). Das Licht hat bei $\lambda = 428$ nm seine größte Intensität und kann mit einem blaulichtempfindlichen Autoradiographiefilm detektiert werden.

Die geblottete Membran wurde zunächst in Blockierungslösung ($0,9 \text{ ml/cm}^2$) für 1 h blockiert und dann in Primärantikörper-Lösung ($0,7 \text{ ml/cm}^2$) für 1 h inkubiert. Die Inkubation fand für alle Schritte bei RT auf einem Schüttler statt. Der folgende Waschschritt bestand aus zweimaligem Abspülen der Membran gefolgt von 2 x 5 min und 1 x 15 min Inkubation in Waschpuffer. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers ($0,7 \text{ ml/cm}^2$ für 1h) und einem weiteren Waschschritt (s.o) begann die Chemilumineszenzdetektion durch Zugabe von $0,18 \text{ ml/cm}^2$ ECL-Detektionslösung (RPN 2106, Amersham). Vor der Belichtung wurde die überschüssige ECL-

Detektionslösung entfernt und die Membran in Frischhaltefolie (Melitta) eingeschlagen. Die Belichtung des Films (Hyperfilm ECL, Amersham) erfolgte in einer Autoradiographiekassette mit Belichtungszeiten zwischen 5 sec. und 10 min. Für die anschließende Entwicklung kamen der Fixierer Unifix (Kodak) und der Entwickler D-19 (Kodak) zu Einsatz. Der Färbung der Markerbanden auf der PVDF-Membran diente eine Coomassie-Blau-Färbung wie in Abschnitt II.5.4.1 beschrieben, allerdings mit kürzeren Färbungs- und Entfärbungsintervallen (je 5 min).

Zur Molekülmassenbestimmung wurden die Membran mit dem Coomassie-Blau-gefärbten Molekulargewichts-Marker und der belichtete Film exakt übereinander ausgerichtet, zusammen eingescannt (s. Abschnitt II.5.4.2) und mit Wincam (V2.2, Cybertec) ausgewertet.

Western-Blot-Immundetektion

Material

Detektionssystem	Hyperfilm ECL, (RPN 3103 Amersham Buchler) ECL Western Blotting detection reagents, (RPN 2106, Amersham)
PBS-Tween	PBS, 0,3 % Tween 20 (Serva)
Blockierungs-Lösung	PBS-Tween, 3 % BSA (Serva)
Waschpuffer	PBS-Tween, 0,3 % BSA (Serva)
Primärantikörper	Anti-human-HCII, Kan 1, Abnahme 7, 02.01.89, Kaninchenserum (Hoechst), 1:20.000 verdünnt in PBS-Tween, 1% BSA Anti-human-Thrombin aus Kaninchen, immunads. ges. Antikörper (Ch.-B.: 62HR/08, Hoechst) 1:20.000 verdünnt in PBS-Tween, 1 % BSA Anti-human-Antithrombin III (k) aus Kaninchen, 900248 (Hoechst), 1:6.000 verdünnt in PBS-Tween, 1 % BSA

5.6 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese trennt ein Proteingemisch in der ersten Dimension zunächst in einer isoelektrischen Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP) und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht in einer SDS-PAGE. Durch geeignete Bedingungen erhält man eine Auflösung von mehreren tausend Proteinspots pro Gel (O'Farrell 1975). Erst durch den Einsatz von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) in der ersten Dimension wurde diese Methode besser reproduzierbar (Görg *et al.* 1988) und stellt derzeit die Standardmethode in der Proteomanalyse dar.

Die 2D-Elektrophorese von Plasma- und rekombinantem HCII aus CHO-Zellen wurde gemeinsam mit C. Priesner in der *Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH* (GBF) an der *Abteilung Zellkulturtechnik* durchgeführt.

2D-Gelelektrophorese**Probenvorbereitung**

Lysis- und Solubilisierungspuffer: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) Chaps, 40 mM Tris-Base, 1 % (w/v) Dithiothreitol, Complete-Mini (1 Tablette/10 ml, Roche), 1 % (v/v) IPG-Puffer (Pharmacia)

Die Proben (2 µg Proteingemisch) und 10 µl Standard (2D-Std., Biorad) in Lysis- und Solubilisierungspuffer verdünnen.

1. Dimension

Gerät: IPGphor (Amersham-Pharmacia), IPGdry strips 18 cm, 4-7 I (Amersham-Pharmacia)

Je 350 µl verdünnte Probe inkl. 2D-Standard (Biorad) in Strip-Halter pipettieren, Schutzfolie von Gelstreifen abziehen und mit der Gelseite nach unten blasenfrei in den Halter einlegen (Polung beachten), mit 2 ml Silikonöl M100 (Roth) überschichten, Deckel auflegen. Beschickten Halter auf Peltier-Elektrodenplatte des IPGphor-Gerätes setzen, Fokussierung starten.

Programm:	max. 50 µA / Gelstreifen		
	2 h	Rehydrierung	20 °C
	300 Vh, 30 V	Rehydrierung	15 °C
	500 Vh, 500 V	Step	15 °C
	1000 Vh, 1000 V	Step	15 °C
	8000 Vh, bis total 200 kVh	Step	15 °C

Fokussierte IPG-Streifen bei -70 °C in Duran-Rundboden-Schraubröhrchen mit Teflon-gedichteten Schraubverschlüssen (Glaswerkstatt GBF) lagern, in denen sie später equilibriert werden.

2. Dimension

Equilibrierungsschritte 1 (Reduktion) und 2 (Carboxamidomethylierung):

Basis-Equilibrierungslösung: 6 M Harnstoff, 50 mM Tris-Base (pH 8,8), 2 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Glycerin in Reinstwasser

Equilibrierungslsg. 1: 1 % (w/v) Dithiothreitol in Basis-Equilibrierungslösung

Equilibrierungslsg. 2: 4 % (w/v) Iodacetamid in Basis-Equilibrierungslösung, Spur Bromphenolblau

IPG-Streifen nacheinander in jeweils 10 ml Equilibrierungslsg. 1 + 2 bei für je 15 min bei RT auf Schüttler inkubieren

Gepufferte Agarose:

Agarose (0,5 % (w/v), low endosmosis, Merck) in 1 x Laufpuffer (25 mM Tris, 198 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) dispergieren, aufkochen und aliquotiert bei -20 °C lagern.

Vor Gebrauch auftauen und in Mikrowelle/Wasserbad schmelzen (75 °C).

Gelkassetten (250 x 200 x 1,5 mm, Gel: 12 % T, 3,6 % C) aus Gießstand (Anderson DALT Multiple Gel Caster, Hoefer/Pharmacia) aus Lagerungslösung (1 % (w/v) SDS, 375 mM Tris, pH 8,8) nehmen, mit Reinstwasser abspülen, mit Unterkante in Milli-Q stellen und mit 1 x Laufpuffer überschichten.

Equilibrierte Streifen abtropfen lassen, auf Geloberkante applizieren, Laufpuffer entfernen und mit der gepufferten Agarose (75 °C) überschichten. 5 min aushärten lassen.

Beladene Kassetten in Tank (Anderson ISO-DALT, Hoefer/Pharmacia) überführen, Vertikalelektrophorese 200 V, ca. 2100 Vh, 5 °C.

5.7 Heparin- und Dermatansulfat-Affinitätschromatographie

Zur Beurteilung der Bindungsaffinität von HCII, AT und deren Thrombinkomplexe an Heparin bzw. Dermatansulfat wurde die Natriumchloridkonzentration bestimmt, bei der das gebundene Protein von dem GAG-Bindungspartner eluiert.

Die Elution von Heparin-Sepharose- bzw. Dermatansulfat-Agarose-Säulen unter reproduzierbaren Bedingungen erfolgte mit einem definierten Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) und linear ansteigendem NaCl-Gradienten. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend im bispezifischen Western-Blot untersucht, bei dem gleichzeitig zwei Proteine (HCII und Thrombin bzw. AT und Thrombin) mit entsprechenden Primärantikörpern detektiert werden konnten. Mit den verwendeten Primärantikörpern gegen die Ausgangskomponenten ließen sich auch die Komplexe nachweisen.

Die Herstellung dieser Komplexe erfolgte wie Abschnitt II.5.3.2 beschrieben. Da die Komplexierungsreaktion unvollständig war, enthielt der Komplexierungsansatz drei Komponenten (Serpine, Thrombin und Komplex), die auf der GAG-Säule getrennt werden konnten.

Die Heparin-Sepharose-Matrix (Pharmacia) ist in Tabelle 7 in Abschnitt II.3.1.2 beschrieben. Die Dermatansulfat-Immobilisierung an Divinylsulfon-aktivierte Agarose (Kem-en-Tec A/S) wurde von D. Dimova im Labor von Dr. Sauber (Hoechst AG) nach der Methode von Zammit *et al.* (1993) durchgeführt. Das verwendete lyophilisierte Dermatansulfat aus Schweinedarm-Mukosa (C3788, Sigma) hatte laut Hersteller eine Reinheit von >90 % und wurde aus Heparin aufgereinigt. Mit einem Tolidin-Blau-Test (Zammit *et al.* 1993) wurden 13,7 mg immobilisiertes Dermatansulfat pro ml Gel gemessen (pers. Mitteilung von D. Dimova).

Die Proben wurden durch Dialyse entsalzt (s. Abschnitt II.1.9 und II.5.3.2) und auf eine Heparin- oder Dermatansulfat-Säule aufgetragen. Dazu kam die in Abschnitt II.3.1.5 beschriebene FPLC-Anlage zum Einsatz. Für die Fraktionierung der HCII- und Komplexierungsansätze wurden selbstgepackte Heparin- bzw. Dermatansulfat-Affinitätschromatographiesäulen verwendet (Gelvolumen: 0,5 oder 1 ml). Für die Trennung der Überstände der Tunicamycin- und Chlorat-behandelten CHO- und HepG2-Zellen kam wegen des größeren Probenvolumens (ca. 50 ml) eine Heparin-HiTrap-Säule (5-ml) zum Einsatz.

Ein Unterschied im Elutionsverhalten einer identischen Probe von Säulen unterschiedlichen Volumens und Geometrie mit identischen Affinitätsliganden konnte unter den verwendeten Bedingungen (Fließgeschwindigkeit etc.) nicht festgestellt werden.

GAG-Affinitätschromatographie zur Bestimmung der NaCl-abhängigen GAG-Affinität**Heparin-Sepharose**

Proben:	THCII- oder TAT-Komplexierungsansätze Kulturüberstand (CHO, HepG2)
Säulen:	0,5 ml Heparin-Sepharose CL-6B in Leersäule HR 5/2, (Pharmacia) * 1,0 ml Heparin-Sepharose CL-6B in Leersäule HR 10/10 (Pharmacia) ** Heparin HiTrap, 5 ml (Pharmacia) ***
Puffer A:	50 mM Tris-HCl, pH 7,4
Puffer B:	50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1,0 M NaCl */*** bzw. 2,0 M NaCl **
Fluß:	0,2 ml/min * 0,5 ml/min ** 1,0 ml/min ***
Equilibrieren:	5 cv Puffer A, cv = Säulenvolumen
Auftragen:	mit Probenschleife*, ** Pumpe A***
Waschen:	5 cv
Elution:	linearer Gradient 10 ml* linearer Gradient 40 ml**/**
Fraktionsvol.:	0,5 ml * 1,0 ml ** 2,0 ml ***

* Bedingungen für Chromatographie der THCII-Komplexe

** Bedingungen für Chromatographie der TAT-Komplexe

*** Bedingungen für Chromatographie der CHO- und HepG2-Überstände

Dermatansulfat-Agarose

Proben:	THCII- oder TAT-Komplexierungsansätze
Säule:	0,5 ml in HR 5/2 Leersäule, (Pharmacia)
Puffer A:	50 mM Tris-HCl, pH 7,4
Puffer B:	50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1,0 M NaCl
Fluß:	0,2 ml/min
Equilibrieren:	5 cv Puffer A, cv = Säulenvolumen
Auftragen:	0,2 ml/min
Waschen:	5cv TCE-Puffer
Elution:	linearer Gradient, 10 ml
Fraktionsvol.:	0,5 ml

5.8 Abspaltung von N-Glykanen mit PNGase F

Zur quantitativen Abtrennung der N-Glykane von HCII wurde das Enzym PNGase F (Peptid-N4-(N-acetyl- β -glucosaminy)asparagin-Amidase) verwendet. PNGase F spaltet die N-glykosidische Bindung zwischen der Aminosäure Asparagin und dem ersten Zuckerbaustein N-Acetylglucosamin des N-Glykans (Abb. 24, vergl. Abb. 11 Abschn. I.5.1), welches dadurch freigesetzt wird (Tarentino *et al.* 1985, Tarentino & Plummer 1994). Für die Enzymreaktion wird die Polypeptidkette mittels Detergenz partiell entfaltet, um alle Glykosylierungsstellen für das Enzym zugänglich zu machen. Dazu wird in einem ersten Schritt das stark denaturierende anionische Detergenz SDS eingesetzt. Im zweiten Schritt wird das SDS durch das nicht-ionische Detergenz Nonidet P-40 (NP-40) verdrängt. Dadurch verringert sich die SDS-Konzentration, so daß die enzymatische Aktivität der PNGase F erhalten bleibt.

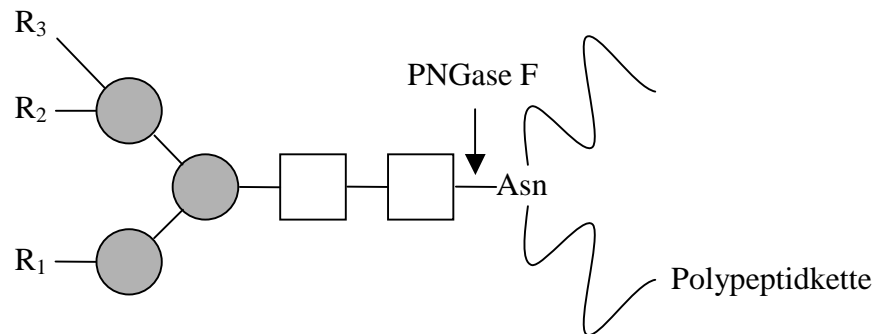


Abb.24: Abspaltung von N-Glykanen mit der Glykoamidase PNGase F. R₁₋₃: Kohlenhydratreste (vgl. Abb 11).

Zur Analyse mittels Western-Blot wurden 10 µg gereinigtes Plasma-HCII in 20 µl 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,6 mit 0,4 % (w/v) SDS für 3 min bei 95 °C denaturiert. Nach Zugabe eines gleichen Volumens von 1,5 % NP-40 (Fluka) in 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,6 erfolgte eine zweite Inkubation für 3 min bei 95 °C mit anschließendem Abkühlen für 10 min auf Eis. Von der rekombinanten PNGase F aus *Flavobacterium meningosepticum* (Boehringer Mannheim) wurde eine 2 mU/µl Lösung in 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,6 angesetzt, und davon 4 µl zu dem vorbereiteten HCII-Ansatz gegeben. Das Stoppen der Reaktion erfolgte nach 24 h Inkubation bei 37 °C durch Aufnehmen in SDS-Probenpuffer und Denaturieren für 4 min bei 95 °C (s. Abschnitt II.5.4).

6 Modellierung von HCII

Das HCII-Modell (Abb. 69 in Abschn. IV.5.1) wurde von dem automatisierten Protein-Modeling-Server „Swiss-Model“ erstellt. Die von diesem Server erzeugte und per e-mail zugesandte Datei enthält die Atomkoordinaten des dreidimensionalen Modells. Mit entsprechender Software kann dieses Modell von allen Seiten betrachtet und in verschiedenen Darstellungen bearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurde das Programm „Swiss-PDB-Viewer“ verwendet.

6.1 Swiss-Model

Der Swiss-Model-Server des *Glaxo Welcome Experimental Research Center* in Genf (<http://www.Expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) erstellt ein Proteinmodell. Ausgangspunkt für diese Modellierung ist die Aminosäure-Sequenz oder der entsprechende Eintrag (für HCII: P05546) in der Proteindatenbank „Swiss-Prot“ (<http://www.Expasy.ch/sprot/>). Die Modellierung nach der Homologie-Methode erfolgt automatisch in mehreren Schritten (Peitsch 1995):

1. Suche nach Proteinen mit bekannter Struktur in der Brookhaven-Proteindatenbank mit mindestens 35 %-Sequenzübereinstimmung.

2. Sequenz-Alignment und 3D-Überlagerung mit den in Schritt 1 gefundenen Muster-Proteinen. Insertionen und Deletionen werden dabei ignoriert. Aus den gemittelten 3D-Überlagerungen der konservierten Sequenzen werden die Atomkoordinaten des Modell-Rahmens mit ProMod berechnet.
3. Lücken in diesem Modellrahmen (meistens Loop-Regionen) werden wiederum mit Hilfe von ähnlichen Sequenz-Motiven mit bekannter Struktur ergänzt.
4. Energie-Minimierung mit Hilfe von CHARMM-Algorithmen
5. Modellverfeinerung durch Optimierung intramolekularer Kontakte und sterischer Verspannungen.

Die Modellierung wurde am 30. 8. 1995 durchgeführt und basierte auf den Strukturen von Antithrombin (1ANT und 1ATH), Elastase-Inhibitor (HLEI), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (1PAI), Ovalbumin (1OVA), α_1 -Antitrypsin (7API) und α_1 -Antichymotrypsin (2ACH). In Klammern stehen die verwendeten Einträge in der Brookhaven Proteindatenbank. Die ersten 100 Aminosäuren konnten mangels Homologie zu bekannten Proteinstrukturen nicht modelliert werden.

6.2 Swiss-PDB-Viewer

Die von Swiss-Model erzeugten Atomkoordinaten des HCII-Modells wurden mit der vom EXPASY-Server heruntergeladenen (<http://www.expasy.ch/spdbv>) Software „Swiss-PDB-Viewer Version 3.6b“ bearbeitet und dargestellt (Guex & Peitsch 1997). Auch die pdb-Datei 2ANT von Antithrombin wurde mit diesem Programm dargestellt (Abb. 1 in Abschn. I.2.3).

III Ergebnisse

1 HCII-Produktion

Humanes HCII wurde aus Blutplasma und HepG2-Zellkulturüberständen gereinigt. Rekombinantes humanes HCII konnte in CHO-Zellen erzeugt werden. Die Produktion der rekombinanten Deletionsmutante HCII Δ 51-76 erfolgte in *E. coli*.

1.1 Humanes Plasma-HCII

Das gereinigte HCII aus humanem Blutplasma stellte das Hauptuntersuchungsmaterial dar und diente als Referenz zu den HCII-Varianten sowie zur Etablierung von Methoden.

1.1.1 Reinigung aus humanem Plasma

Die Reinigung von HCII aus humanem Plasma umfaßte Fällungsschritte (PEG, BaCl₂) sowie Affinitätschromatographie, Anionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration (s. Abschnitt II.3.1). Aus jeweils ca. 200 ml Plasma konnten nach der abschließenden Mono-Q-Chromatographie um 7 mg HCII isoliert werden. Das so gereinigte Material wurde für alle Versuche bis auf die Glykosylierungsanalytik eingesetzt. Für die Glykosylierungsanalytik kam zur weiteren Reinigung eine Gelfiltration zum Einsatz.

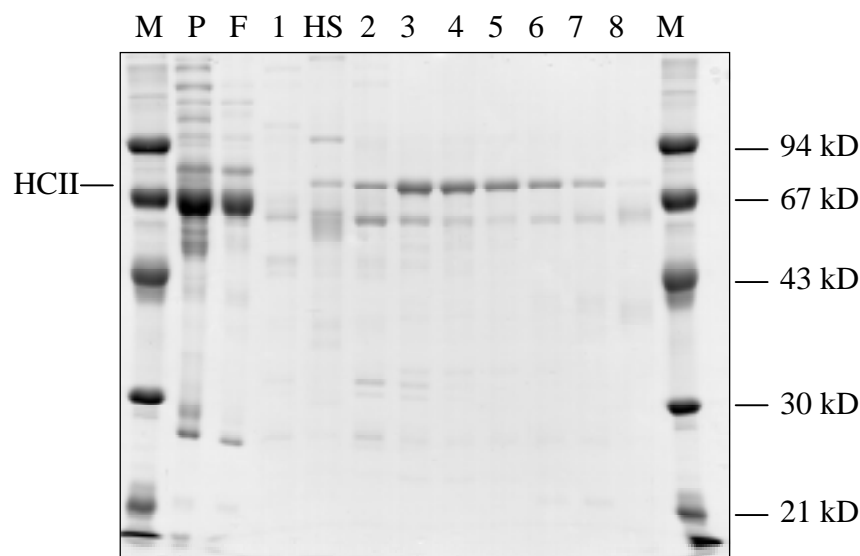


Abb. 25: SDS-PAGE (Protean II xi, Biorad) mit Coomassie-Blau-Färbung einer Plasma-HCII Reinigung. M: Größenmarker (LMW); P: humanes Plasma; F: gelöstes Pellet nach der letzten PEG -Fällungsschritt; HS: Heparin-Sepharose-Eluat, dialysiert; Spur 1-8: Elutionsfraktionen der Mono-Q-Säule.

In dem ersten Teil der Aufarbeitung erfolgte eine relative HCII-Anreicherung durch fraktionierte PEG-Fällungen in Verbindung mit einer BaCl_2 -Fällung. Nach Hao *et al.* (1980) werden bei 35 g/l PEG Fibrinogen und bei 135 g/l PEG die Proteine Plasminogen, Komplementfaktoren, Immunglobuline G und M sowie β -Lipoproteine ausgefällt. Bei dem letzten PEG-Fällungsschritt mit einer PEG-Gesamtzugabe von 250 g/l präzipitieren neben HCII u. a. auch Albumin, α_2 -Macroglobulin, IgA, Prothrombin, AT, α_1 -saurer Glykoprotein, Haptoglobin und Transferrin (Hao *et al.* 1980). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten PEG-Fällungen bedeutet die Angabe X g/l PEG eine Zugabe von X g PEG pro Liter vorgelegtes Volumen (s. Abschnitt II.3.1).

In dem SDS-Gel (Spur P, F, Abb. 25) ließ sich nach den Fällungsschritten eine Verringerung von Proteinen im hochmolekularen Bereich (> 94 kD) sowie bei 25 und 50 kD feststellen. Bei letzteren könnte es sich um Immunglobuline (leichte und schwere Kette, 25 bzw. 50 kD) oder Fibrinogen (47-67 kD) handeln. Der Effekt von BaCl_2 auf die Fällung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (Deacon & Howell 1976, Griffith *et al.* 1985) wie z.B. Prothrombin und die Faktoren VII, IX und X ließ sich im Gel wegen der geringen Konzentrationen dieser Proteine nicht erkennen.

Durch die anschließende Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie konnte eine gezielte Reinigung von HCII erreicht werden, bei der auch Albumin (67 kD) fast vollständig abgereichert wurde (s. Spur HS in Abb. 25).

Zwei im SDS-Gel sichtbare Banden oberhalb von 94 kD und um 64 kD ließen sich durch die folgende Anionentauscher-Chromatographie abreichern. Von der Mono-Q-Säule eluierte HCII mit einem Maximum bei etwa 220 mM NaCl (Abb. 26).

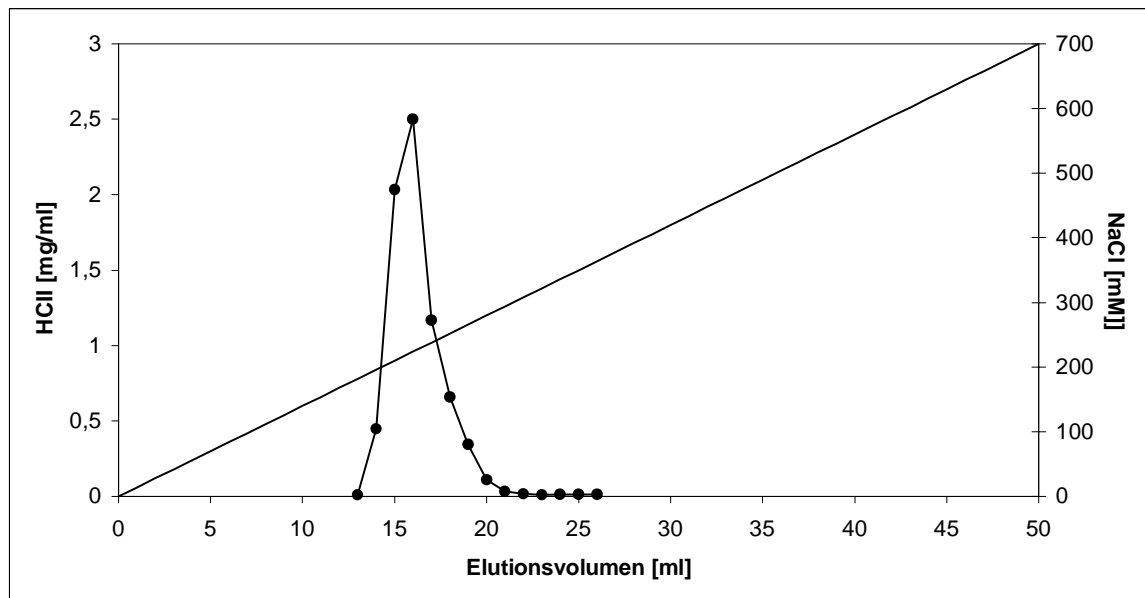


Abb. 26: Elutionsprofil der Anionentauscher-Chromatographie (Mono-Q). Die HCII-Konzentrationen wurden mit ELISA gemessen.

Die Anionenaustauscher-Chromatographie bewirkte eine wesentliche Aufkonzentrierung von HCII, das allerdings noch kontaminierende Proteine enthielt. Die Hauptverunreinigung bei 64 kD wurde im anti-HCII-Western-Blot nicht angefärbt, war also kein HCII-Abbauprodukt. Für die Glykosylierungsanalytik wurde diese Verunreinigung mit Hilfe der Gelfiltration weiter abgereichert (s.u.). Die Ausbeute (Tab. 10) betrug nach der Mono-Q-Chromatographie 36 % und entsprach damit dem bei Griffith *et al.* (1985), Tran *et al.* (1986) und Zhang *et al.* (1994) angegebenen Wert von ca. 40 %. Die größten Verluste entstanden bei den PEG-Fällungen 3+4 und der Umpufferung durch Ultrafiltration (Sartocon Micro, 30 kD MWCO). Die Ultrafiltration wurde daher in späteren Aufreinigungen durch den in Abschnitt II.3.1 beschriebenen Dialyse-Schritt ersetzt.

Tab. 10: Typisches Beispiel einer Reinigung von HCII aus humanem Blutplasma. Die HCII-Konzentrationen wurden mit ELISA bestimmt.

Reinigungsstufe	Konzentration [mg/ml]	Volumen [ml]	HCII [mg]	Wiederfindung [%]
Blutplasma	0,084	218	18,3	100
Fällung 1 (35 g/l PEG)	0,080	210	16,8	92
Fällung 2 (BaCl ₂)	0,081	219	17,7	97
Fällung 3 (135 g/l PEG)	0,061	228	13,9	76
Fällung 4 (100 g/l PEG)	0,046	237	10,9	60
Fällung 5 (250 g/l PEG)	0,049	229	11,2	61
Heparin-Sepharose	0,211	47	9,9	54
Umpuffern (Ultrafiltration)	0,199	34	6,8	37
Mono-Q*	0,6; 2,1; 2,0; 1,0; 0,6; 0,3	6x1 ml	6,6	36

* HCII-haltige Fraktionen

Für die Glykosylierungsanalytik wurden 6 Mono-Q-Fraktionen einer anderen Aufarbeitung mit insgesamt 4,5 mg HCII durch Gelfiltration mit einer Superdex 200 HR 10/30 Säule weiter gereinigt. Das Endprodukt enthielt laut Analyse des SDS-Gels mit Coomassie-Färbung keine deutlich erkennbaren Verunreinigungen mehr (Abb. 27). Lediglich in der Spur P3 bei der höchst konzentrierten Probenauftragung war bei 67 kD noch eine geringe Verunreinigung zu erkennen, die sich jedoch densitometrisch kaum noch erfassen und quantifizieren ließ.

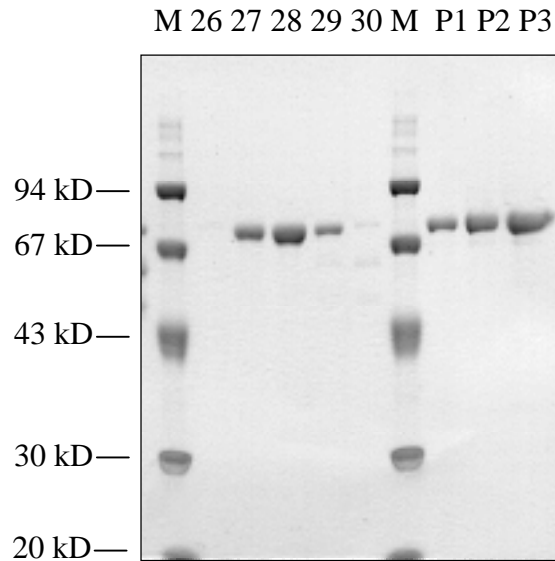


Abb. 27: SDS-PAGE/Coomassie-Blau-Färbung des isolierten HCII nach der Gelfiltration. Mono-Q gereinigtes HCII wurde mittels Gelfiltration (Superdex 200) für die Glykoanalytik weiter aufgereinigt. M: Größenmarker (LMW); 26-30: Elutionsfraktionen der Superdex-Säule; P1-3: Pool von Fraktionen 27+28 der Superdex-Säule (Probe für Glykosylierungsanalytik) jeweils 0,7, 1,4, bzw. 2,8 μg HCII aufgetragen.

1.1.2 Biologische Aktivität des gereinigten Plasma-HCII

Das gereinigte Material wurde auf biologische Aktivität getestet. Dazu diente der Nachweis der Thrombin-HCII-Komplexe (THCII) mit Hilfe des Western-Blots. Zur Immundetektion kamen polyklonale Anti-Thrombin-Antikörper in Verbindung mit einem Anti-HCII-Kaninchenserum, dessen polyklonale Antikörper auch an den THCII-Komplex binden, zum Einsatz. Im Western-Blot ließ sich mit diesen Antikörpern bei 75 kD HCII, bei 102 kD der Thrombin-HCII-Komplex (THCII) und bei 38 kD Thrombin nachweisen.

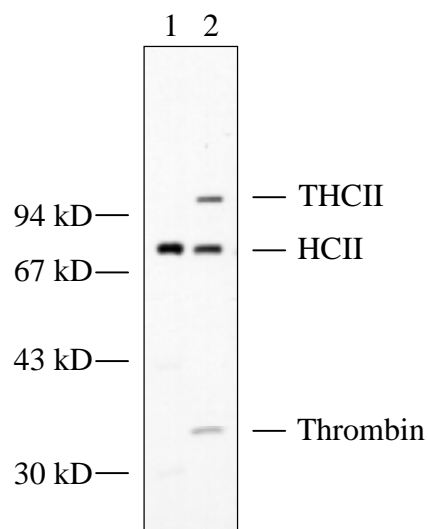


Abb. 28: Bispezifischer Western-Blot mit zwei polyklonalen Primär-Antikörpern gegen HCII bzw. Thrombin. Spur 1: Plasma-HCII; Spur 2: Thrombin-HCII-Komplexierungsansatz. Plasma-HCII und Thrombin wurden equimolar (jeweils 1 μM) in 110 μl Komplexierungsansatz für 2 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ ohne GAGs inkubiert.

Unter den Bedingungen im reduzierenden SDS-Gel müßte sich eine Molekülmasse des THCII-Komplexes von 93 kD ergeben. Diese berechnet sich aus der Molekülmasse von Thrombin (37 kD inkl. Glykosylierung) abzüglich A-Kette (5,6 kD) und der Molekülmasse von HCII (65,6 kD inkl. Glykosylierung) abzüglich 4,2 kD des abgespaltenen C-terminalen Peptids. Letzteres wird vermutlich infolge der Komplexbildung abgespalten (s. Abschnitt I.2.4) und durch die reduzierende SDS-Denaturierung der Probenvorbereitung ebenso wie die A-Kette des Thrombins vom Restprotein abgetrennt. Die im SDS-Gel beobachtete höhere apparente Molmasse wird vermutlich durch die N-Glykosylierungen von HCII und Thrombin verursacht.

1.1.3 Kinetik der Thrombinhemmung durch Plasma-HCII

Von dem gereinigten Plasma-HCII wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion mit Thrombin in Gegenwart verschiedener Dermatansulfat-Konzentrationen bestimmt (s. Abschn. II.5.3.1). So sollte getestet werden, ob das gereinigte Material in seinen kinetischen Parametern mit den Literaturdaten übereinstimmt. Bei dem kinetischen Test wurden Bedingungen der Kinetik pseudo-erster Ordnung gewählt, bei denen der Inhibitor im ca. 10fachen Überschuß vorlag. Die Inhibierungsreaktion wurde zum Zeitpunkt t gestoppt und die Rest-Thrombinaktivität kinetisch photometrisch gemessen. Da die gemessene Extinktionsänderung pro Zeiteinheit $\Delta A/\Delta t$ proportional zur aktiven Thrombinkonzentration $[T]$ ist, konnte statt $\ln([T]_0/[T]_t)$ der Term $\ln(\Delta A_0/\Delta A_t)$ gegen t aufgetragen werden. Aus der Steigung k' ließ sich dann die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_2 ermitteln. In Abwesenheit von GAGs betrug k' $0,0012 \text{ min}^{-1}$ und damit $k_2 = 1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Abb. 29).

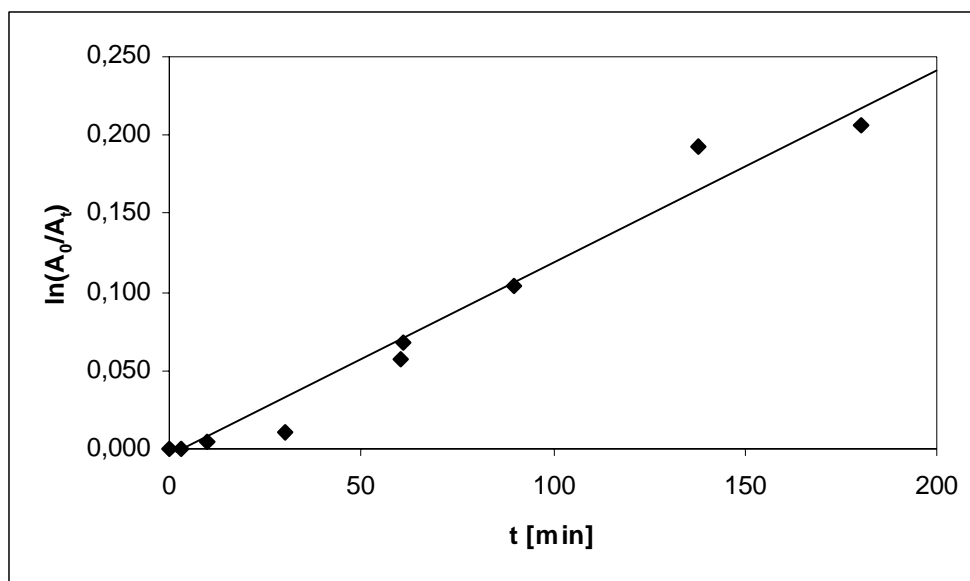


Abb. 29: Plot zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_2 für die Inhibition von Thrombin durch HCII ohne Zusatz von Glykosaminoglykanen. Bedingungen: Thrombin (9,17 nM) und HCII (100 nM) wurden bei 25 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte die Bestimmung der Rest-Thrombinaktivität nach Versetzen von 100 μl des Ansatzes mit 500 μl Chromozym TH (200 μM).

In Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ Dermatansulfat (Abb. 30) betrug k_2 $4,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ und mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Dermatansulfat $1,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. Damit lag die Dermatansulfat-katalysierte Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 15.000 über der nicht GAG-aktivierten Reaktion. Die Literaturangaben betragen $7,2 \times 10^8$ (Pratt *et al.* 1989) oder $4,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Maaroufi *et al.* 1997) für die GAG-aktivierte Thrombin-Hemmung und liegen um den Faktor 7.500 bis 15.650 über den Geschwindigkeitskonstanten der nicht GAG-katalysierten Reaktion. Die Diskrepanzen zu den Literaturwerten lassen sich abgesehen von Meßgenauigkeiten hauptsächlich durch unterschiedliche Meßbedingungen wie Temperatur (37 °C oder RT), pH-Wert (8,0 oder 7,4), Reinheit der Proteine und Qualität bzw. Herkunft des Dermatansulfats (z.B. Sulfatierungsgrad) erklären. Auch die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde unterschiedlich durchgeführt (ELISA, UV-Absorption, Titration).

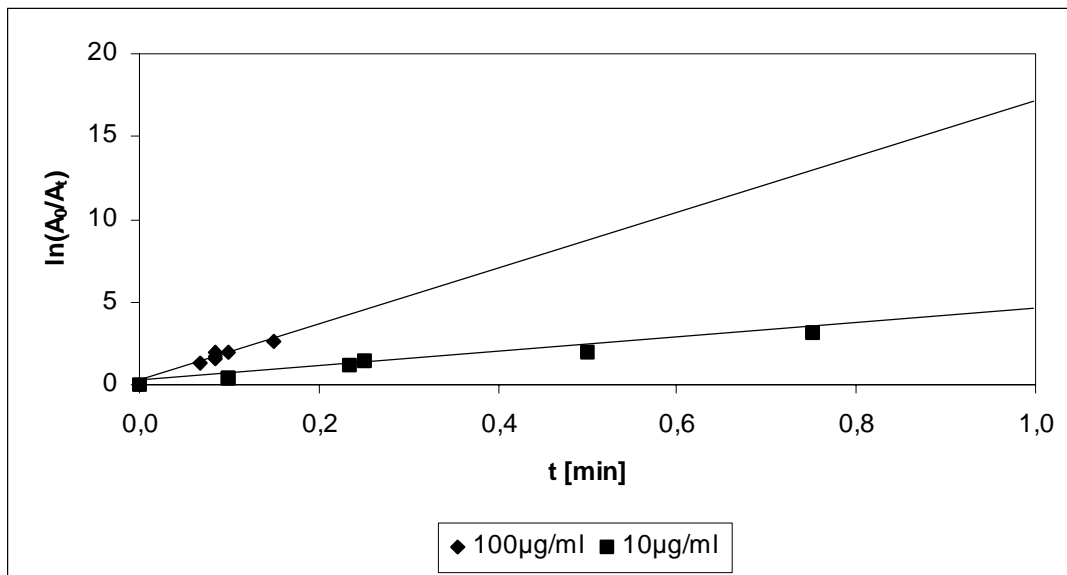


Abb. 30: Plot zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_2 für die Inhibition von Thrombin durch HCII in Gegenwart von Dermatansulfat. Bedingungen: 10 bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ Dermatansulfat, HCII (100 nM) und Thrombin (9,17 nM) wurden in einem 100 μl -Ansatz bei 25 °C für verschiedene Zeitintervalle inkubiert. Die Bestimmung der Rest-Thrombinaktivität erfolgte nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 500 μl Chromozym TH.

1.2 Herstellung von rekombinantem HCII in CHO-Zellen

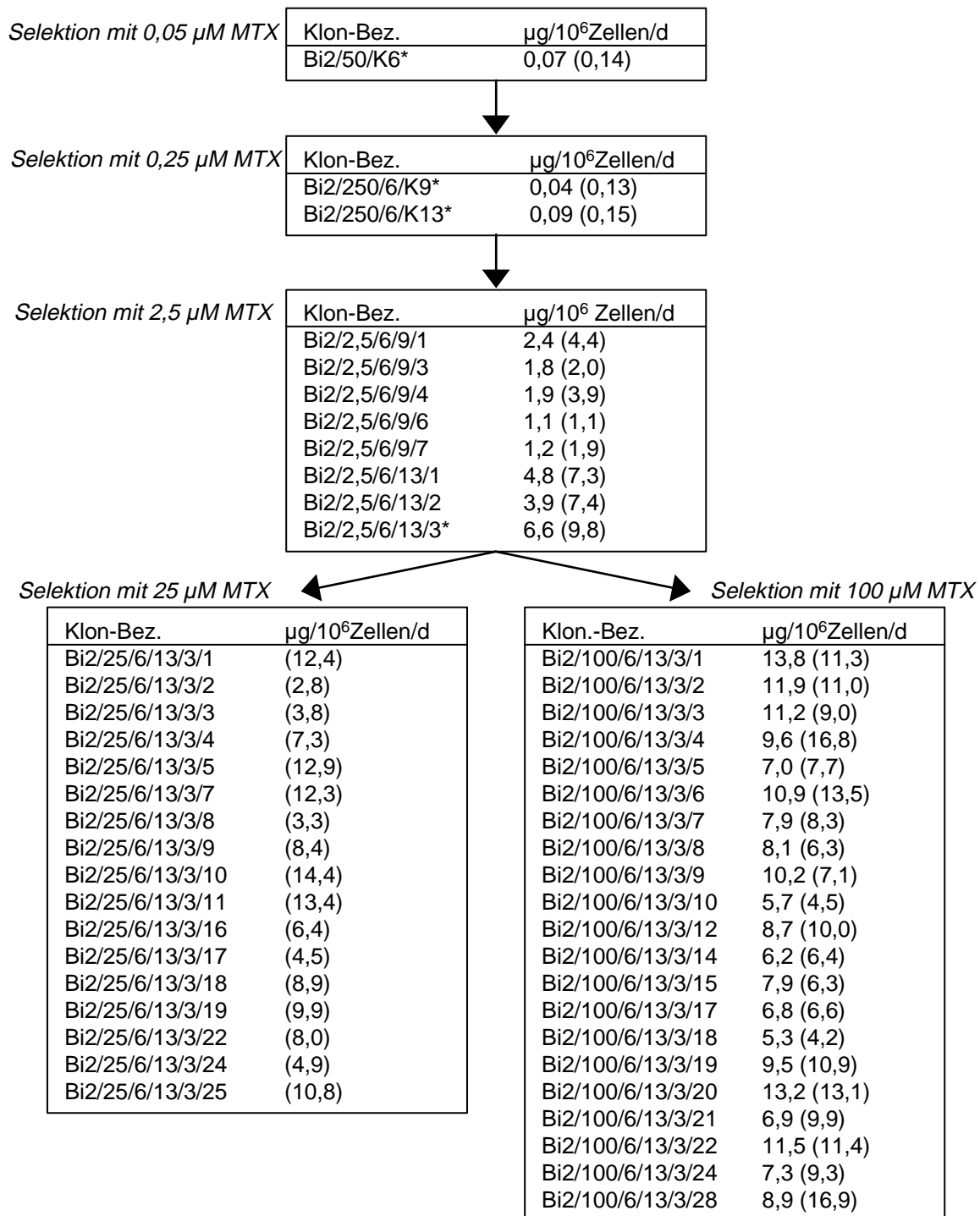
CHO-Zellen wurden mit zwei Plasmiden, die jeweils die cDNA von humanem HCII und Maus-Dihydrofolatreduktase (DHFR) enthielten, kotransfiziert und mit MTX koamplifiziert. Die Transfektion nahm H. Ragg vor, die Zellkultur während der MTX-Amplifikation wurde von A. Strathmann durchgeführt. Rekombinantes HCII aus serumfreien Überständen einer gerührten, membranbegasten Kultur (Superspinner) wurde gereinigt und hinsichtlich Identität, biologischer Aktivität und posttranslationaler Modifikationen überprüft.

1.2.1 CHO_{HCII}-Herstellung

DHFR-defiziente CHO-Zellen wurden mit den Plasmiden pWTBI2 und pSV2dhfr wie in Abschnitt II.1.2.1 beschrieben kotransfiziert. Die Transfektion erfolgte mit verschiedenen Plasmidmengen (0,01, 0,1 und 5,0 µg) pro Kulturplatte (Ø 9,2 cm), wobei lediglich die höchste Plasmidmenge in der ersten MTX-Selektionsstufe bei 0,05 µM MTX eine ausreichende Anzahl resistenter Klone gewährleistete. Auf der ersten und zweiten Selektionsstufe (0,05 bzw. 0,25 µM MTX) ließ sich HCII im Überstand der resistenten Klone erst nach Konzentration mittels Ultrafiltration (Mircesep 30, Pall/fFiltron) durch ELISA nachweisen.

Die spezifische HCII-Produktivität einzelner Klone während der weiteren MTX-Amplifikation zeigt Abbildung 31. Mit der Erhöhung der MTX-Konzentration von 0,05 auf 0,25 µM konnte keine meßbare Steigerung der HCII-Expression erreicht werden. Erst nach einer um das 10-fache auf 2,5 µM gesteigerten MTX-Konzentration ließen sich Klone mit z. T. über 100fach höherer HCII-Expression gegenüber dem Ausgangsklon isolieren. Von dieser 2,5 µM MTX-Stufe wurde der Klon Bi2/2,5/6/13/3 mit der höchsten HCII-Expression parallel auf 25 und 100 µM MTX gesetzt, wobei die Expression einiger der dabei selektierten Klone sich noch einmal etwa verdoppelte. Die spezifische HCII-Produktivität gut wachsender Klone betrug bis zu 17 µg/10⁶Zellen/d, wenn Medium mit 10 % FCS zu Kultivierung verwendet wurde (Abb. 31). Für die Bestimmung der spezifischen Produktivitäten wurden die Zellen auch parallel auf serumfreies Medium gesetzt. Die Zellen besaßen auch ohne Serum-Zusatz eine vergleichbare Produktivität.

Abb. 31: Stammbaum der CHO_{HCII}-Klone, die während Genamplifikation mit der DHFR/MTX-Methode isoliert wurden. Angegeben ist jeweils die spezifische Produktivität q in serumfreiem und serumhaltigem Selektionsmedium mit 10 % FCS (Werte in Klammern) auf fünf MTX-Selektionsstufen. Die Stufen mit 0,05, 0,25 und 2,5 μM MTX wurden nacheinander, die Stufen mit 25 und 100 μM MTX parallel mit demselben Klon der 2,5 μM MTX-Stufe durchgeführt. Das serumfreie Selektionsmedium enthielt Insulin und Transferrin. Zur Bestimmung der spezifischen Produktivität wurden konfluente Kulturen trypsinisiert und 2-3 d in serumhaltigem bzw. -freiem Medium in 10 cm Kulturschalen inkubiert. Die Bestimmung der HCII-Konzentration erfolgte mit ELISA und die Zellzahl-Bestimmung mit Trypan-Blau-Färbung. Die gekennzeichneten Klone (*) dienen der weiteren Amplifikation.



1.2.2 Superspinner-Kultivierung

Für die Produktion von rekombinantem HCII im Superspinner wurde ein gut produzierender und wachsender CHO-Klon (Bi2/100/6/13/3/19) der 100 μM MTX-Amplifikationsstufe verwendet, der in Vorversuchen (Abb. 31) 10,9 μg HCII/10⁶ Zellen/d exprimierte. Um die Reinigung des rekombinanten HCII zu erleichtern, sollte der Kulturüberstand möglichst frei von FCS sein, um eine Kontamination mit Rinder-HCII zu vermeiden.

Dies konnte durch sukzessives Ausverdünnen von FCS während des wiederholten satzweisen Betriebes mit serumfreiem Medium erreicht werden. Die Serumkonzentration betrug im letzten Satz, der für die Aufreinigung verwendet wurde, ca. 0,1 %. Die mögliche Verunreinigung des Produktes mit Rinder-HCII aus FCS ist daher kleiner als 1 %, wenn man von einer mit humanem Plasma vergleichbaren HCII-Konzentration im FCS ausgeht. In Abb. 32 ist das Kulturvolumen und die Lebendzellendichte während der Superspinner-Kultivierung dargestellt. Es wurde mit ca. 2×10^5 Zellen/ml angeimpft und die Kultur bei Erreichen einer ausreichend hohen Zelldichte in der logarithmischen Wachstumsphase mit entsprechendem serumfreiem Medium (s. Abschnitt II.1.8) ausverdünnt. Dazu wurde ein Teil der Zellsuspension entnommen (Satz 2 und 4) und frisches Medium zugegeben oder auf ein größeres Kulturvolumen aufgefüllt (Satz 3).

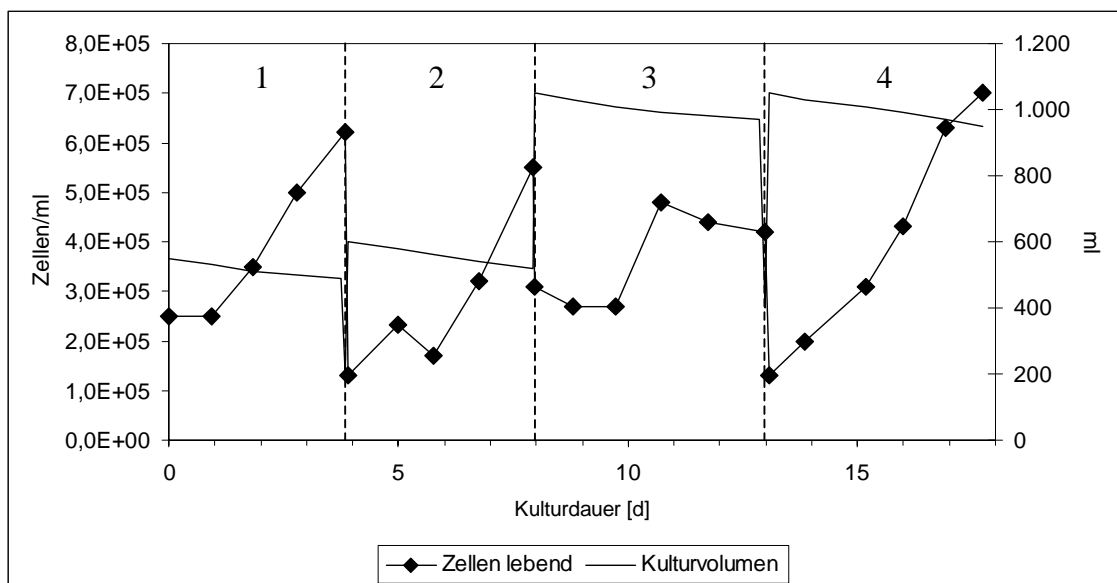


Abb. 32: Verlauf der Superspinner-Kultivierung der CHO_{HCII}-Zelllinie Bi2/100/6/13/3/19.

Eine Kontrolle der Superspinnerkultivierung erfolgte auch hinsichtlich der Nährstoffe (Glucose und Aminosäuren) sowie Lactat. Der Verlauf des für die Aufreinigung verwendeten vierten Satzes ist in den Abbildungen 33 und 34 wiedergegeben. Die Lebendzellendichte betrug zum Ende der Kultivierung 7×10^5 Zellen/ml bei einer Viabilität von 80 %. Lactat, ein in höheren Konzentrationen wachstumshemmend wirkendes Stoffwechselprodukt (Kempken 1992), lag mit maximal 16 mM im unkritischen Bereich. Alle Nährstoffe, insbesondere Glucose und Glutamin sowie weitere essentielle Aminosäuren waren im letzten Satz ausreichend vorhan-

den, also oberhalb der jeweiligen K_S -Werte (Heidemann 1995). Die Monod-Konstante K_S gibt dabei die Konzentration eines limitierenden Nährstoffes an, bei der die Kultur nur noch mit der halben maximalen Wachstumsrate wächst.

Nach dem dritten Satz wurden zum Ausverdünnen 500 ml Zellsuspension entnommen und damit ein zweiter Superspinner angeimpft, der parallel unter den gleichen Bedingungen betrieben wurde.

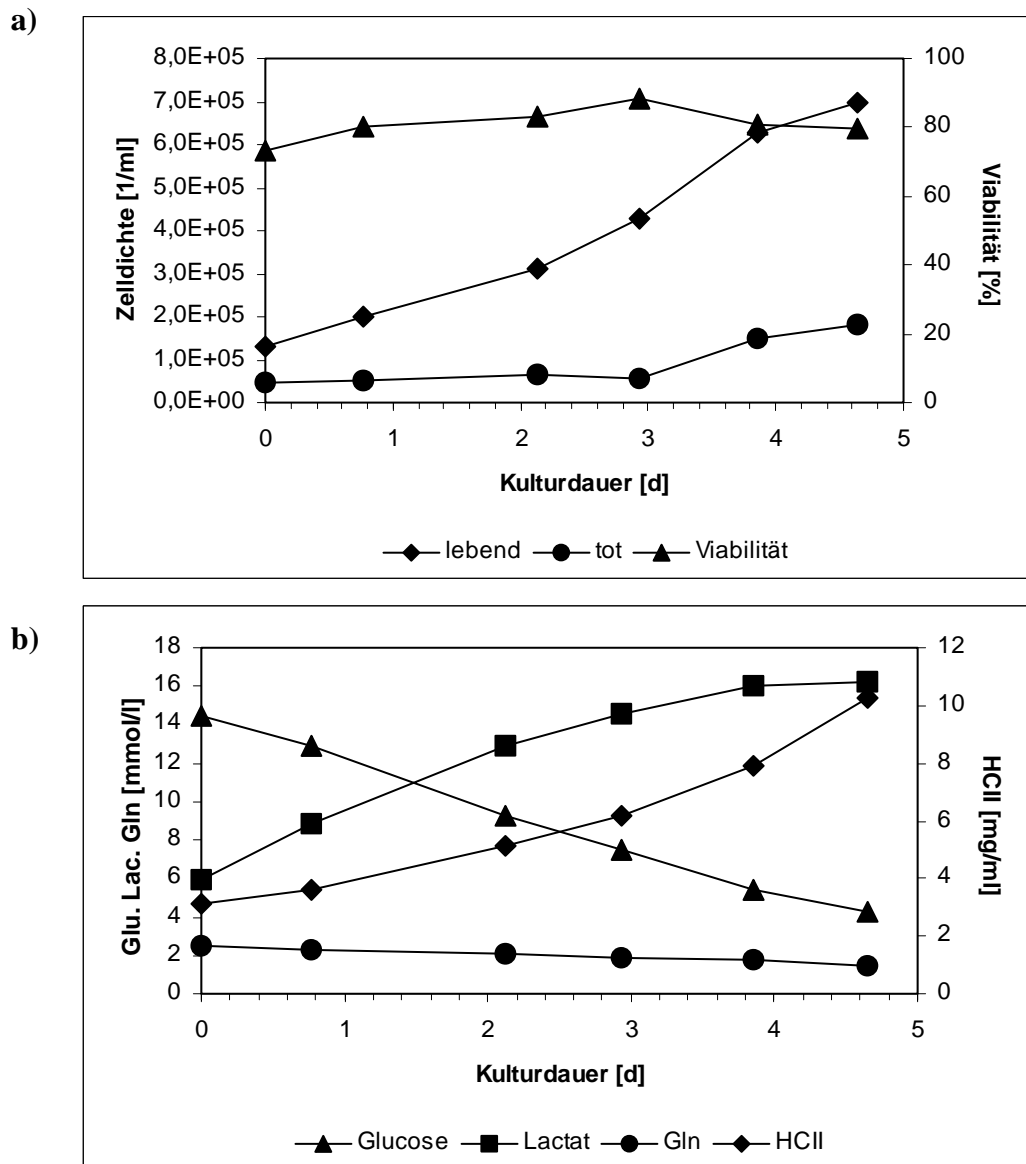


Abb. 33: Verlauf des vierten Satzes der in Abbildung 32 gezeigten 1-l-Superspinner-Kultivierung. a) Zelldichte und Viabilität b) Konzentrationen von Glucose, Glutamin, Lactat und HCII im Kulturüberstand.

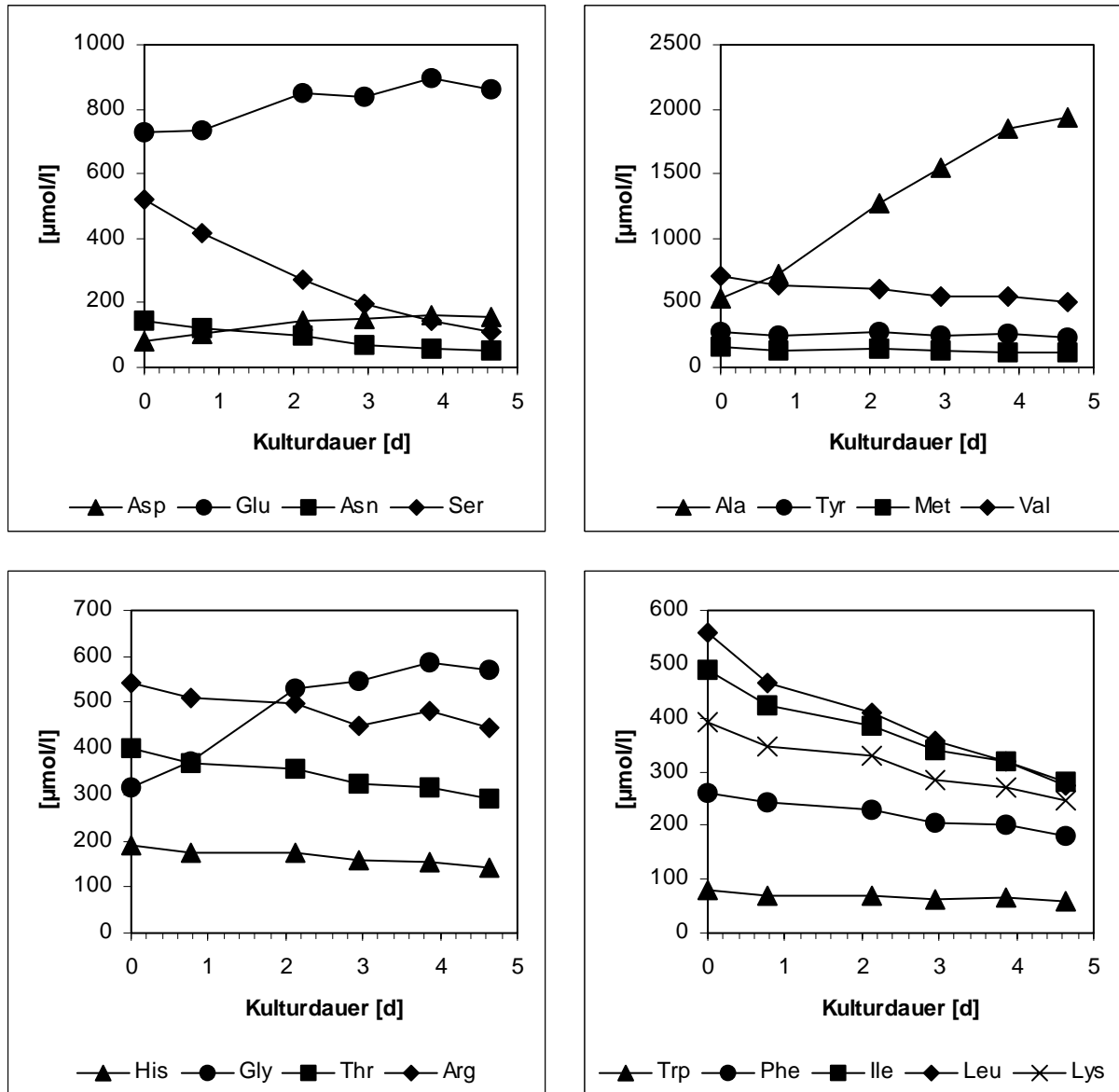


Abb. 34: Verlauf des vierten Satzes der in Abbildung 32 gezeigten 1-l-Superspinner-Kultivierung. Darstellung der Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand.

1.2.3 Reinigung von CHO-HCII

Die beiden Superspinner enthielten zum Zeitpunkt der Ernte eine HCII-Konzentration von 10,3 bzw. 10,6 µg/ml. Die Konzentrierung, Dialyse und Reinigung von 1 l Kulturüberstand erfolgte wie in Abschnitt II.3.2 beschrieben. Nach diesem Reinigungs-Schema mit abschließender Mono-Q-Chromatographie betrug die Ausbeute 43 % (Tab.11). Die Reinheit für die Glykosylierungsanalytik war jedoch noch nicht ausreichend, da im SDS-Gel (Coomassie-Blau-Färbung) noch deutliche Nebenbanden zu sehen waren. Deshalb wurde zunächst mit Heparin-Sepharose (HiTrap, 5 ml) rechromatographiert. Dabei kam anstatt eines NaCl-Stufengradienten ein linearer NaCl-Gradient (40 ml, 1 ml/min, 0-1 M NaCl) zum Einsatz. Eine Nebenbande bei 60 kD konnte durch einen weiteren Reinigungsschritt mittels Gelfiltration abgereichert werden. Das so gereinigte HCII zeigte in der SDS-PAGE (Abb. 35) keine Verunreinigung mehr. Durch die zusätzlichen Reinigungsschritte sank allerdings die Ausbeute. Bei der Gelfiltration wurden zwei Fraktionen mit reinem HCII gewonnen, wovon 300 µl einer Fraktion (28) nach Dialyse gegen 20 mM (NH₄)HCO₃ zur GBF nach Braunschweig gegeben wurden. Die Probe enthielt 0,3 mg rekombinantes HCII und wurde in der Arbeitsgruppe von H. S. Conradt für die Glykosylierungsanalytik eingesetzt.

Tab 11: Reinigung von CHO-HCII aus Superspinner-Kultivierung für die Glykosylierungsanalytik. Die HCII-Konzentrationen wurden mit ELISA bestimmt.

Reinigungsschritt	HCII	Ausbeute
Kulturüberstand (1000 ml)	10,3 mg	100 %
nach Ultrafiltration	8,9 mg	86 %
nach H.-S.-Chromatographie und Dialyse	7,4 mg	72 %
Pool, Mono-Q-Fraktionen	4,4 mg	43 %
	davon 2,3 mg weiter gereinigt	
nach H.-S.-Chromatographie	1,8 mg	
nach Superdex 200-Chromatographie	0,8 mg	

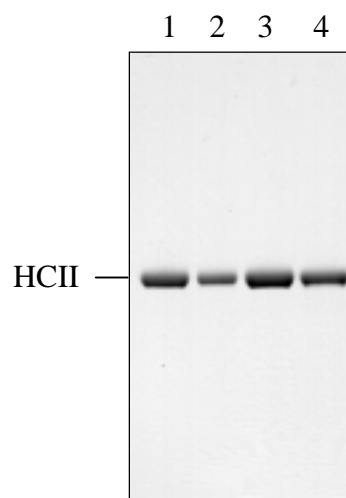


Abb. 35: SDS-PAGE (Coomassie-Blau-Färbung) von gereinigtem HCII der CHO-Superspinner-Kultivierung. Fraktionen der Gelfiltration (Superdex 200). Spur 1: Probe von CHO-HCII für die Glykosylierungsanalytik (Fraktion 28, dialysiert gegen 20 mM (NH₄)HCO₃, pH 8,0), 2,7 µg HCII aufgetragen; Spur 2: wie Spur 1 aber nur 1,35 µg HCII aufgetragen; Spur 3: Fraktion 28 (Superdex 200); Spur 4: Fraktion 29 (Superdex 200).

1.2.4 Eigenschaften des gereinigten HCII aus CHO-Zellen

Die Identität des rekombinanten Proteins wurde durch die Immunreaktivität mit monoklonalen Antikörpern im ELISA und mit dem anti-HCII-Kaninchenserum im Western-Blot nachgewiesen.

Weitere Analysen dieses Materials wurden in der GBF von H. S. Conradt und Mitarbeitern durchgeführt: Der ansequenzierte N-Terminus des CHO-HCII mit der Aminosäure-Sequenz GSKGPLDQLEKGGGE... wies auf eine korrekte Abspaltung des 19 Aminosäure langen Signalpeptids hin. Ein tryptischer Fingerprint zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen dem rekombinanten HCII und Plasma-HCII (Böhme *et al.* 2001).

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität des rekombinanten HCII wurde die Thrombin-Hemmung von CHO_{HCII}-Überständen gemessen und mit der Aktivität von Plasma-HCII unter gleichen Bedingungen verglichen. Dazu wurden Kulturüberstände verschiedener Klone mit Thrombin komplexiert und die Restaktivität des nicht gehemmten Thrombins mit dem chromogenen Thrombin-Substrat (Chromozym TH) ermittelt. Die daraus berechneten (s. Abschnitt II.5.3.2) HCII-Konzentrationen zeigten Abweichungen von den ELISA-Werten der gleichen Proben (Tab. 12). Da parallel gemessenes gereinigtes Plasma-HCII eine vergleichbare Abweichung aufwies, kann für rekombinantes und gereinigtes Plasma-HCII eine vergleichbare biologische Aktivität angenommen werden.

Weiterhin wurde die Komplexbildung von equimolaren Mengen HCII (rekombinant sowie aus Plasma) und Thrombin mittels Western-Blot untersucht (Abb. 36). Die ermittelte apparente Molmasse des rekombinanten CHO-HCII lag bei 78 kD und damit 3 kD höher als bei Plasma-HCII. Die Größe der HCII-Komplexe lag bei 101 kD bei Plasma-HCII, und bei 103 kD bei CHO-HCII. Die etwas unterschiedliche elektrophoretische Mobilität könnte auf Glykosylierungsunterschiede hinweisen.

Tab. 12: Biologische Aktivität von HCII in CHO-Kulturüberständen. Serumfreie Kulturüberstände von HCII produzierenden CHO-Klonen wurden in Gegenwart von 100 µg/ml Dermatansulfat mit Thrombin (9,17 nM) versetzt. Aus der Restaktivität des Thrombins wurde die Konzentration des durch HCII gehemmten Thrombins berechnet (s. Abschn. II.5.3.2). Jeweils Mehrfachmessungen mit unterschiedlich vorverdünnten Proben. Die HCII-Konzentration der gleichen Proben wurden zum Vergleich mit ELISA gemessen

Klon-Bezeichnung (MTX-Amplifikationsstufe)	HCII-Konz. (Aktivitätstest)	HCII-Konz. (ELISA)	Verhältnis Spalte 3/Spalte2
Bi2/50/6 (0,05 µM MTX)	n.n.	n.n.	
Bi2/250/6/13 (0,25 µM MTX)	n.n.	n.n.	
Bi2/2,5/6/13/3 (2,5 µM MTX)	0,9 µg/ml (13,7 nM)	3,4 µg/ml (51,8 nM)	3,8
Bi2/100/6/13/3/4 (100 µM MTX)	2,4 µg/ml (36,6 nM)	6,2 µg/ml (94,5 nM)	2,6
Bi2/100/6/13/3/28 (100 µM MTX)	2,3 µg/ml (35,1 nM)	5,3 µg/ml (80,8 nM)	2,3
Plasma-HCII (gereinigt)	550 µg/ml (8384 nM)	1455 µg/ml (22180 nM)	2,7
n.n.: nicht nachweisbar			

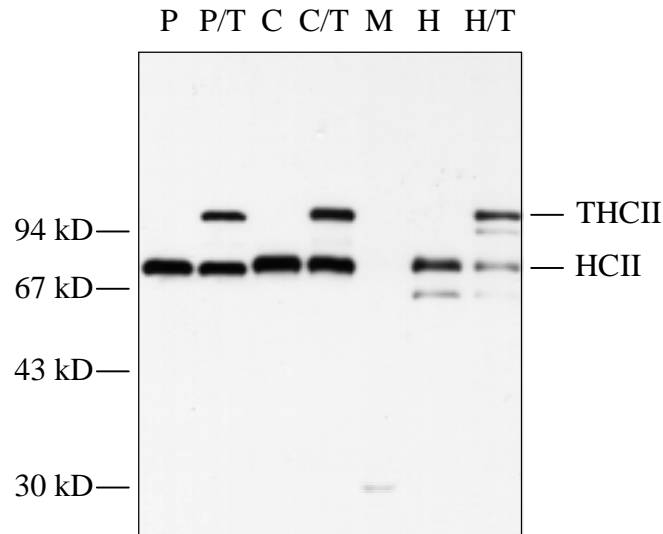


Abb. 36: Western-Blot von Thrombinkomplexen des gereinigten HCII aus der CHO-Superspinner-Kultivierung aus Plasma und HepG2-Zellen. Thrombin und HCII wurden in 200 μ l TBS in Gegenwart von 100 μ g/ml Dermatan-sulfat für 10 min bei RT inkubiert (s. Abschnitt II.5.3.2).

P: gereinigtes Plasma-HCII;

P/T: Plasma-HCII/Thrombin-Komplexierungsansatz (40 nM HCII, 40 nM Thrombin);

C: gereinigtes CHO-HCII;

C/T: CHO-HCII/Thrombin-Komplexierungsansatz (40 nM HCII, 40 nM Thrombin);

M: Größenmarker (LMW, Positionen am linken Rand eingezeichnet);

H: gereinigtes HepG2-HCII;

H/T: HepG2-HCII/Thrombin-Komplexierungsansatz (15 nM HCII, 40 nM Thrombin)

Apparente Molekularmassen der Banden:

Plasma-HCII/Thrombin: 75/101 kD

CHO-HCII/Thrombin: 78/103 kD,

HepG2-HCII/Thrombin: Hauptbanden 78/103 kD, Nebenbanden 66/95 kD.

1.3 HCII aus HepG2-Zellen

HepG2-Zellen dienen der Erzeugung von nicht rekombinantem humanem HCII. Insbesondere wurde von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, die N-Glykosylierung von HCII durch Kultivierung in Gegenwart von Tunicamycin zu unterdrücken (s. Abschn. II.1.9.1).

Mit serumfreiem Medium (s. Abschnitt II.1.2.2) ließen sich pro T175-Flasche etwa 5 µg gereinigtes HCII erzeugen. Das gereinigte HepG2-HCII hatte im SDS-Gel (Abb. 37a) – wie auch rekombinantes HCII aus CHO-Zellen – eine mit 78 kD um 3 kD höhere apparente Molekülmasse als gereinigtes Plasma-HCII. Im Western-Blot zeigte sich eine ausgeprägte Nebenbande bei 66 kD, das vermutlich kein nachträgliches (nach der Reinigung) proteolytisches Spaltprodukt darstellt, sondern bereits im Kulturüberstand vorhanden ist (Hellweg 2000). Dieses anti-HCII-immunreaktive Protein hat ähnliche physiko-chemische Eigenschaften wie das 78 kD HCII, da es parallel mit aufgereinigt wurde. Es eluierte von Heparin-Sepharose mit dem Stufengradienten bei 0,2 M NaCl und zeigte auch auf dem Anionentauscher das gleiche Elutionsverhalten.

In Abb. 37 sind die HCII-haltigen Fraktionen (ELISA) der Mono-Q Elutionsfraktionen gezeigt. Nach der Inkubation von HepG2-HCII mit Thrombin in Gegenwart von Dermatansulfat (Abb. 36 Spur H u. H/T) wurden THCII-Komplexe bei 103 kD beobachtet und damit die biologische Aktivität des HepG2-HCII belegt. Auch die 66 kD-Nebenbande scheint mit Thrombin zu komplexieren (Bande bei 95 kD).

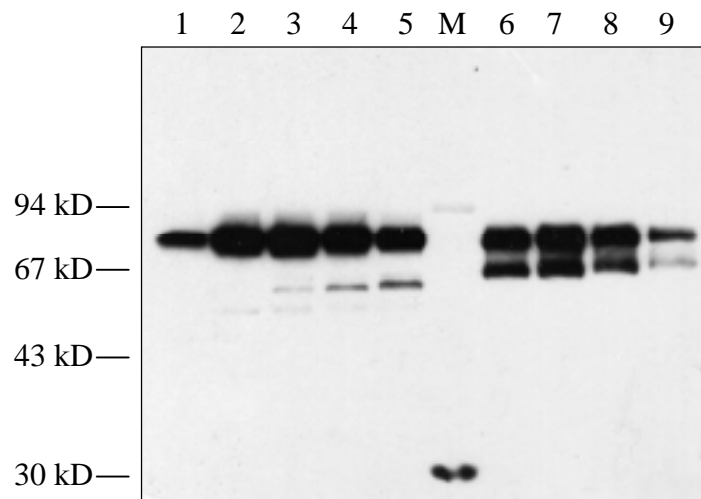


Abb. 37: a) Western-Blot von gereinigtem HCII aus CHO- und HepG2-Zellen. Spur 1-5: gereinigtes CHO-HCII, Mono-Q Fraktionen; M: LMW-Marker; Spur 6-9: gereinigtes HepG2-HCII, Mono-Q-Fraktionen.

MW der Hauptbanden [kD]: CHO: 78; HepG2: 78 kD. MW der Nebenbanden [kD]: CHO: 61; HepG2: 66 kD.

1.4 Expression der Deletionsmutante HCII Δ 51-76 in *E. coli*

Die Deletionsmutante HCII Δ 51-76 sollte wegen ihrer erhöhten Heparin-Affinität (Ragg *et al.* 1990a) als Sonde dienen, um potentielle Glykosaminoglykan-abhängige Wirkungsorte von HCII in der extrazellulären Matrix zu identifizieren. Durch die Deletion der Aminosäuren 51-76 (s. Abb. 4 in Abschn. I.3.3) entfällt die Konkurrenz um die GAG-Bindungsstelle zwischen GAGs mit dem N-Terminus (s. Abb. 5 in Abschn. I.3.4).

Für die rekombinante Herstellung von HCII Δ 51-76 wurde *E. coli* BL21(DE3) in Verbindung mit dem pET-System als Expressionssystem verwendet. Bei diesem System induziert das Galaktoseanalogon Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) die Expression der T7-RNA-Polymerase, die ihrerseits das Zielgen auf dem Plasmid-Vektor transskribiert (s. Abschn. II.2). Bei allen Expressionsversuchen kam Klon 1 (*E. coli* BL21(DE3)/pCBO1 Klon 1) zum Einsatz. Zunächst wurden mit Schüttelkolben-Kulturen die Expressionsparameter optimiert, um einen möglichst hohen Anteil der Deletionsmutante HCII Δ 51-76 in löslicher Form zu produzieren.

1.4.1 Schüttelkolbenkultivierung

Um die Aggregation von HCII in *inclusion bodies* zu reduzieren, wurde daher zum Zeitpunkt der Induktion die Kultivierungs-Temperatur von 37 °C auf 25 °C gesenkt, um die Syntheserate herabzusetzen (Schein & Noteborn 1988). Abbildung 38 zeigt den Verlauf der HCII-Expression während der IPTG-Induktion. Es wurde nach Herstellervorschrift (Novagen-System-Manual, 1997) bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,4 mM IPTG induziert.

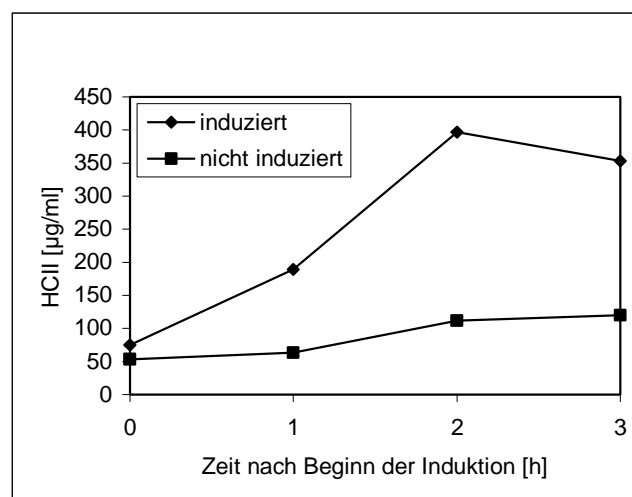


Abb. 38: Zeitverlauf der Induktion von *E. coli* BL21(DE3)/pCBO1. 125 ml Kultur in 500 ml Schüttelkolben wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,6 nach Absenkung der Temperatur von 37 °C auf 25 °C mit 0,4 mM IPTG induziert. Die Proben wurden in 1/10 Volumen Lysepuffer lysiert und die HCII-Konzentrationen im Zellysat mit dem ELISA gemessen.

Da Wildtyp-HCII aus *E. coli* von Heparin-Sepharose bei 0,4 M NaCl eluiert (Blinder & Tollesfen 1990), wurde für die Reinigung der Mutante ein zweistufiger Stufengradient (0,5 und 1,0 M NaCl) gewählt, bei dem HCII Δ 51-76 mit der erwarteten höheren Heparin-Affinität bei 1 M NaCl eluiert.

In Heparinbindungsversuchen konnte die hohe Affinität bestätigt werden. Wie Abb. 57 in Abschnitt III.5.2 zeigt, eluierte HCII Δ 51-76 in der Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie im Mittel mit einem Maximum bei 860 mM NaCl.

Aus 2 l Bakterienkultur (8 x 250 ml) in 1-l-Schikanekolben (s. Abschn. II.2.2) konnte nach 2 h Induktion mit 0,4 mM IPTG 528 μ g lösliches HCII Δ 51-76 von Heparin-Sepharose mit diesem Stufengradienten (s. Abschnitt II.3.3) eluiert werden.

1.4.2 Expression von HCII Δ 51-76 im 5-l-Maßstab

Um die Deletionsmutante HCII Δ 51-76 im Milligramm-Maßstab zu erzeugen, konnte ein 7-l-Reaktor mit einem Arbeitsvolumen von 5 l der *AG Fermentationstechnik* der Technischen Fakultät benutzt werden. Der Fermenter bot nicht nur den Vorteil eines größeren Kulturvolumens, sondern auf Grund der besseren Sauerstoffversorgung der Zellen ließen sich gegenüber der Schüttelkolben-Kultivierung höhere Bakterientiter erzielen. Um diesen Vorteil auszunutzen, erfolgte die Induktion erst bei einem höheren Bakterientiter (OD_{600}) als bei der Schüttelkolbenkultivierung. Daher ging der Produktionsphase, in der die Induktion erfolgte, ein Fermentations-Satz voran, mit dem Ziel den erreichbaren Bakterientiter (OD_{600}) zu ermitteln (Abb. 39).

In diesem ersten Satz konnte wegen einer sich abflachenden Wachstumskurve bei einer OD_{600} von 7,0 davon ausgegangen werden, daß sich die Zellen der stationären Phase näherten. Für den darauffolgenden zweiten Satz wurde die Hälfte (2,5 l) der Kultur abgelassen und mit dem gleichen Volumen Medium aufgefüllt. Nach dem Herunterkühlen auf 25 °C erfolgte bei einer OD_{600} von 3,5 die Induktion mit 0,4 mM IPTG. Nach 2 h 35 min Inkubation mit IPTG wurde die Kultur abgeerntet.

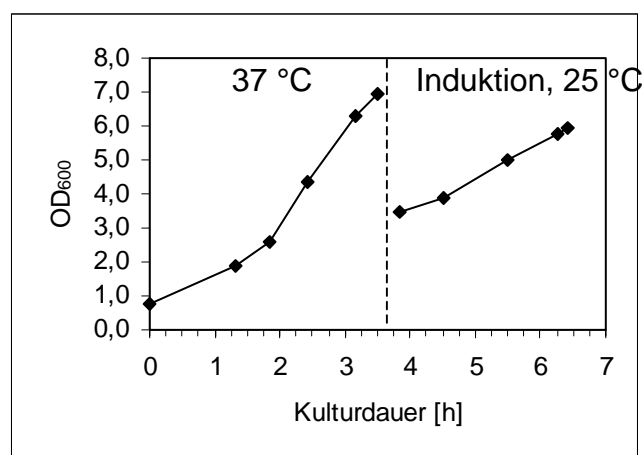


Abb. 39: Kulturverlauf der 5-l-Fermentation von *E. coli* BL21(DE3)/pCBO1.

1.4.3 Reinigung von HCII Δ 51-76 aus der 5-l-Fermentation

Von 5 l Kultur wurden die Zellen abzentrifugiert, die Zellpellets in 250 ml Lyse-Puffer re-suspendiert und aufgeschlossen (s. Abschn. II.3.3). Die Elution erfolgte nach dem Auftragen des Lysats auf eine 30 ml Heparin-Sepharose-Säule in zwei Stufen (0,5 und 1,0 M NaCl). Das Eluat (30 ml) der Elution mit 1M NaCl wurde vor dem Auftragen auf den Kationenaustauscher (Resource S) durch Dialyse entsalzt und umgepuffert.

Die Abbildung 40a und Tabelle 13 geben einen Überblick über die Reinigung. Bei der Heparin-Sepharose-Chromatographie banden 5,1 % des in *E. coli* erzeugten HCII Δ 51-76 an die Säule, und 3,3 % eluierten bei 1,0 M NaCl (Tab. 13). Kontrollversuche bestätigten, daß die Bindungskapazität nicht überschritten wurde. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß das HCII Δ 51-76 im Durchlauf und im Eluat mit 0,5 M NaCl nicht in nativer Konformation, sondern in denaturierter und/oder aggregierter Form vorlag.

Durch den Stufengradienten ließ sich bereits eine Abreicherung von anderen Proteinen erreichen, wie der Vergleich von Spur 2 (Elution mit 0,5 M NaCl) und Spur 3 (Elution mit 1,0 M NaCl) zeigt (Abb. 40a). Nach der Dialyse des Eluats (1,0 M NaCl) war eine deutliche weiße Trübung des Dialysats zu beobachten, wobei sich das Präzipitat durch Zentrifugation bei 10.000 x g abtrennen ließ. Spur 3 und 4 zeigen den Überstand vor und nach Dialyse (einschl. Zentrifugation). Auffällig ist dabei das Verschwinden einer Proteinbande bei 67 kD. Die Bande bei 49 kD stellt HCII Δ 51-76 dar, wie der Western-Blot (Abb. 40b) zeigt. Das Präzipitat bestand demnach vermutlich hauptsächlich aus dem 67 kD-Protein und zu einem erheblichen Anteil aus HCII Δ 51-76. Die ELISA-Auswertung der Proben (Tab. 13) zeigt, daß infolge der Dialyse und Präzipitatbildung 60 % des HCIIs verloren ging.

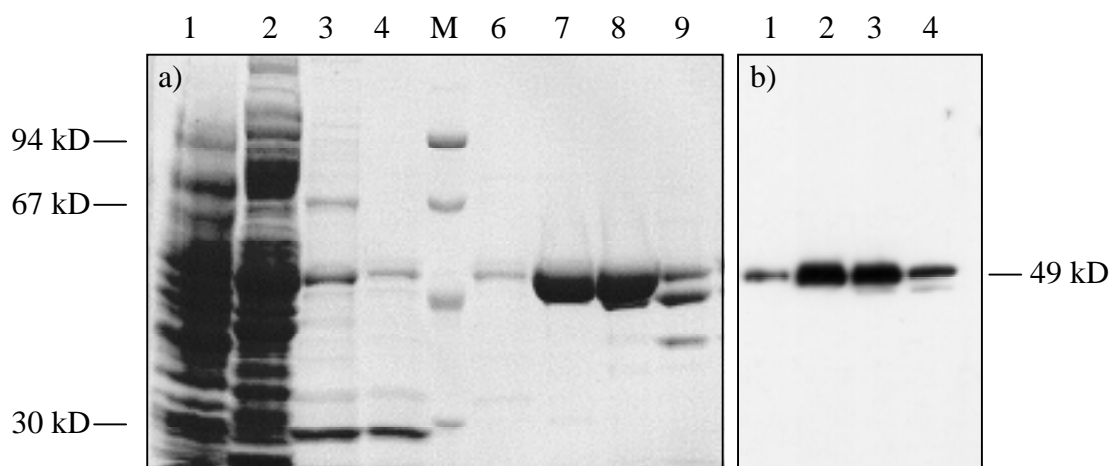


Abb. 40: Aufreinigung von HCII Δ 51-76 aus dem Zellysat der 5-L-Fermentation von *E.coli*-BL21(DE3)/pCBO1.

a) SDS-PAGE, Coomassie-Blau-Färbung. Spur 1: Zellysat; Spur 2: Elution von Heparin-Sepharose mit 0,5 M NaCl; Spur 3+4: Heparin-Sepharose-Elution mit 1,0 M NaCl vor bzw. nach Dialyse/Zentrifugation; M: Gößenmarker (LMW); Spur 6-9: Resource-S-Elutions-Fractionen 15-18 mit 310, 330, 350 bzw. 370 mM NaCl (vergl. Abb. 41).

b) Western-Blot. Spur 1-4: wie Spur 6-9 in a).

Von der Resource S-Säule eluierte HCII Δ 51-76 bei 340 mM NaCl (Abb. 41). Die entsprechenden Elutionsfraktionen sind in Abbildung 40 a und b zu sehen. Von den hinsichtlich HCII Δ 51-76 reinsten Fraktionen 16 und 17 wurde der Proteingehalt mittels ELISA und dem BCA-Assay bestimmt (Tab. 13). Die deutliche Differenz zwischen den ELISA-Werten und der BCA-Bestimmung kann an der Verwendung von BSA als Standard für den BCA-Test liegen. Auch die Konzentrationsbestimmung von HCII Δ 51-76 mittels ELISA liefert u.U. ungenaue Ergebnisse, da der Test für Wildtyp-Plasma-HCII entwickelt wurde und Plasma HCII auch als Standard diente.

Aus der 5-l-Fermentation ließen sich dem BCA-Test zufolge insgesamt 2,0 mg gereinigtes HCII Δ 51-76 gewinnen.

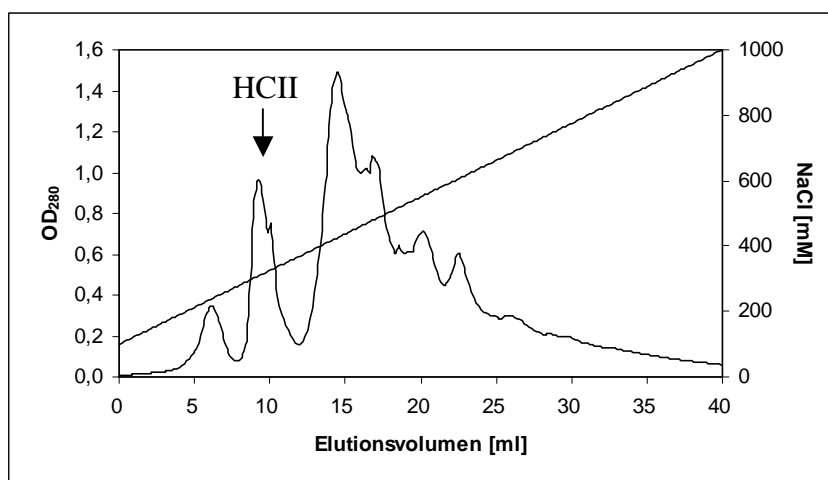


Abb. 41: 5-l-Fermentation, Reinigung von HCII Δ 51-76 mittels Kationenaustauscher-Chromatographie (Resource-S). HCII eluiert mit einem Maximum bei 340 mM NaCl (Fraktionen 16 und 17).

Tab. 13: Reinigung von HCII Δ 51-76 aus der 5-l-Fermentation von *E. coli* BL21(DE3)/pCBO1. Konzentrationsbestimmung mit ELISA bzw. BCA-Test (Werte in Klammern).

Reinigungsstufe	Volumen [ml]	HCII Δ 51-76 [mg]	Ausbeute [%]
Lysat	250 ml	735,5	100
Heparin-Sepharose			
Eluat 0,5 M NaCl	50 ml	13,0	1,8
Eluat 1,0 M NaCl	30 ml	24,5	3,3
<i>dto.</i> nach Dialyse u. Zentrifugation	30 ml	9,9	1,3
Resource S			
Fraktion 15	1 ml	0,3	0,0
Fraktion 16	1 ml	4,8 (0,9) *	0,7
Fraktion 17	1 ml	4,6 (1,1) *	0,6
Fraktion 18	1 ml	0,8	0,1

* Proteinbestimmung mit BCA-Test

1.4.4 Molekularmasse und isoelektrischer Punkt von HCII Δ 51-76

Durch die Deletion der Aminosäuren 51 bis 76 wurden aus Wildtyp-HCII 13 saure Aminosäuren und 2 negativ geladene Sulfatreste, aber nur eine positiv geladene Aminosäure (Lysin 65) entfernt. Darüber hinaus können die N-Glykane des Plasma-HCII zahlreiche negativ geladene Sialinsäuren besitzen. Der experimentell ermittelte isoelektrische Punkt (pI) von Plasma-HCII liegt bei 4,95-5,15 (Tollefsen *et al.* 1982).

Aus der Aminosäure-Sequenz läßt sich der pI mit einem entsprechenden Programm des EXPASY-Servers ermitteln (Compute pI/Mw, http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Der pI von Wildtyp-HCII ohne posttranslationale Modifikationen beträgt damit rechnerisch 6,26, während der ebenso ermittelte pI von HCII Δ 51-76 bei 9,08 liegt.

Aus der Aminosäuresequenz ergibt sich eine berechnete Molekülmasse von HCII Δ 51-76 von 52 kD, während die apparente Molmasse im SDS-Polyacrylamidgel 49 kD betrug (Abb. 40).

2 Analyse der posttranslationalen Modifikationen von HCII

HCII aus humanem Plasma und aus CHO-Zellen wurde hoch aufgereinigt (s. Abschn. III.1.1.1 u. III.1.2.3) und für die Analyse der posttranslationalen Modifikationen der Arbeitsgruppe *Proteinglykosylierung* an der GBF in Braunschweig überlassen und dort von H. S. Conradt, M. Nimtz und Mitarbeitern untersucht. Es sollte die Struktur der N-Glykane aufgeklärt werden, sowie die Belegung der drei Konsensus-Sequenzen mit N-Glykanen. Weiterhin galt das Interesse den Unterschieden zwischen rekombinantem HCII aus CHO-Zellen und dem nativen Vergleichsmaterial aus humanem Plasma hinsichtlich der Glykosylierung und Tyrosin-Sulfatierung.

Bei diesen Untersuchungen kamen massenspektrometrische Methoden (MS) mit Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-Ionisation in Verbindung mit einem Flugzeit-Detektor (MALDI-TOF-MS) und die Elektrospray-Ionisation-MS (ESI-MS) zum Einsatz. Eine Anionenaustauscher-Chromatographie-Methode, die in stark alkalischem Milieu durchgeführt wird (HPAEC-PAD), diente der quantitativen Analyse der N-Glykane. Eine allgemeine Beschreibung dieser Methoden findet sich bei Lottspeich & Zorbach (1998). Die Methoden und Ergebnisse sind detailliert bei Böhme *et al.* (2001) dargestellt und werden hier zusammengefaßt wiedergegeben.

2.1 Struktur der N-Glykane

Für die vollständige Belegung der drei N-Glykosylierungs-Konsensus-Sequenzen von HCII aus CHO- und HepG2-Zellen gab es bereits Hinweise durch die Versuche mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin (s. Abb. 58 u. 60 in Abschn. III.5.3:). Die anschließenden massenspektrometrischen Analysen zeigten, daß alle tryptischen Peptide, welche die Konsensus-Sequenz (N-X-S/T; s. Abschn. I.5.1) tragen (${}_{30}\text{NLSMPLLPADFHK}_{42, 166}\text{DFVNASSK}_{173, 365}\text{SMTNRT}_{370}$), glykosyliert sind.

Die vorherrschende biantennäre Struktur der N-Glykane vom komplexen Typ wurde mit Lektin-Bindungsstudien von R. Eckert (Diplomarbeit, 1999) in der *AG Zelluläre Genetik* für Plasma-HCII ermittelt. Die Analysen in der GBF bestätigten diese Ergebnisse, ermöglichten darüber hinaus jedoch eine genaue Analyse der Strukturvarianten.

Die N-Glykane von HCII aus Plasma und rekombinant aus CHO-Zellen sind vom komplexen Typ und vorwiegend (> 80 %) biantennär (Abb. 42 u. Tab. 14). Triantennäre Strukturen machen nur einen Anteil von 7-8 % aus. Höher als dreifach verzweigte Strukturen kommen nicht vor bzw. liegen unter der Nachweisgrenze. Die Sialylierung der terminalen Galactose-Reste ist bei beiden HCII-Varianten fast vollständig und lag bei 90 % (Plasma) bzw. 96 % (CHO). Im Gegensatz zu Plasma-HCII sind die N-Glykane von CHO-HCII überwiegend (80-90 %) proximal fucosyliert und die terminalen Sialinsäuren sind $\alpha(2\rightarrow3)$ verknüpft anstatt $\alpha(2\rightarrow6)$ wie bei Plasma-HCII.

Auch Plasma-HCII trägt Fucose-Reste, die jedoch nicht mit dem proximalen N-Acetylglucosamin-Rest verknüpft sind. Mit Hilfe der Tandem-ESI-MS konnte die Position bestimmt

werden, indem von dem fucosylierten triantennären N-Glykan (m/z 3793) ein Tochterionenspektrum erzeugt wurde. Dieses zeigte, daß die Fucose mit dem peripheren N-Acetylglucosamin in Position 3 verknüpft ist. Eine in dieser Weise fucosylierte Kohlenhydrat-Sequenz (Abb. 42) entspricht der Lewis^X-Determinante. Etwa 60 % der triantennären N-Glykane tragen ein oder zwei dieser Lewis^X-Motive.

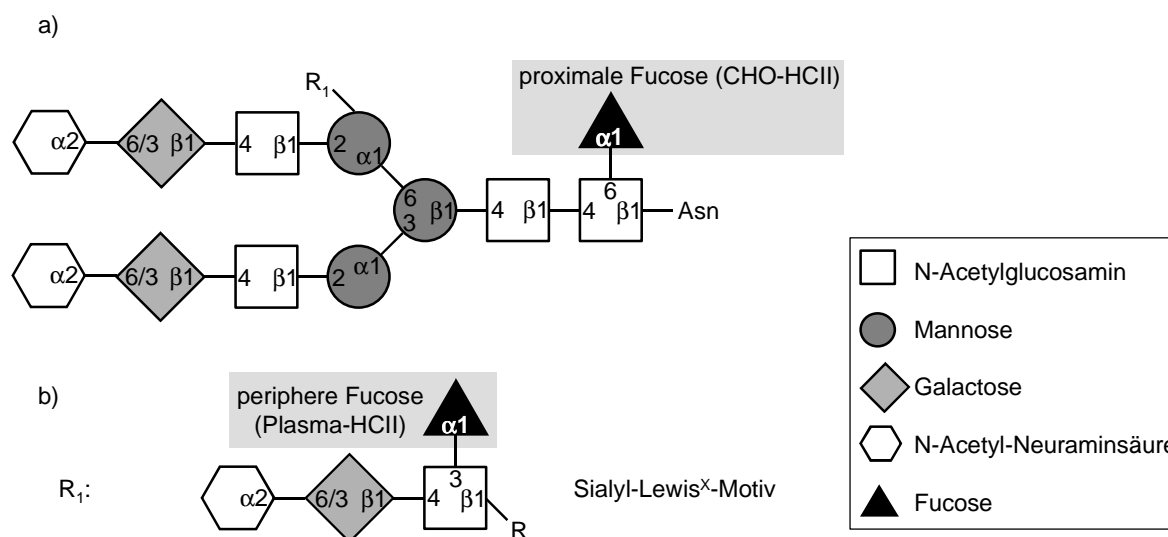


Abb. 42: Biantennäres N-Glykan vom komplexen Typ (a), das den Hauptanteil der N-Glykane von HCII darstellt. 7-8 % der N-Glykane sind triantennär und tragen am Trimannosyl-Core einen dritten Oligosaccharidrest (R_1). Eine proximale Fucose besitzen nur N-Glykane von HCII aus CHO-Zellen, während eine periphere Fucosylierung der N-Glykane nur bei einem Anteil von Plasma-HCII detektiert wurde. HCII aus Plasma ist $\alpha(2\rightarrow6)$ -sialyliert, während CHO-Zellen Sialinsäuren in $\alpha(2\rightarrow3)$ -Stellung verknüpfen. b) Durch die periphere Fucosylierung in Position 3 des N-Acetylglucosamins entsteht ein Lewis^X-Motiv bzw. bei terminaler Sialylierung ein Sialyl-Lewis^X-Motiv.

Tab. 14: Strukturvarianten der N-Glykane von HCII aus humanem Plasma und rekombinant aus CHO-Zellen. Die enzymatisch abgespaltenen und desialylierten N-Glykane wurden mittels HPAEC-PAD getrennt. Zur Identifizierung wurden die Retentionszeiten mit denen von N-Glykanen bekannter Struktur verglichen.

Struktur	Plasma-HCII [%]	rekombinantes HCII (CHO) [%]
biantennär	84	8,7
biantennär mit prox. Fucose	-	82
biantennär mit peripherer Fucose (Lewis ^X)	2	n.n.
triantennär	7,5	1,5
triantennär mit proximaler Fucose	n.n.	7,6
triantennär mit peripherer Fucose (Lewis ^X)	7	n.n.
terminale Sialylierung (Verknüpfung)	96 ($\alpha 2-6$)	90 ($\alpha 2-3$)

n.n. nicht nachweisbar

2.2 Analyse der Tyrosin-Sulfatierungen

Zur Untersuchung der Tyrosin-Sulfatierungen wurde HCII tryptisch verdaut und die Peptide zunächst mit MALDI-TOF untersucht. Das Massenspektrum zeigte jedoch keine Sulfatreste an den tryptischen Peptiden 43-65 und 66-101, die laut Hortin *et al.* (1986) die beiden sulfatierten Tyrosin-Reste 60 und 73 enthalten. Durch den Einsatz besonders schonender Ionisierungs-Bedingungen mit der ESI ließen sich im Massenspektrum die korrespondierenden Massen der sulfatierten Peptide nachweisen und der Sulfatierungsgrad quantifizieren. Ca. 90 % des kleineren Peptids 43-65 waren in beiden HCII-Varianten sulfatiert. Das größerer Peptid 66-101 von Plasma-HCII war fast vollständig sulfatiert, während das entsprechende Peptid von CHO-HCII zu 70-80 % Sulfatreste trug. Die Position der Sulfatreste in den beiden Peptiden ließ sich nicht mit ESI-MS/MS bestimmen. Beide Peptide enthalten jedoch nur jeweils einen Tyrosin-Rest, der von dem typischen Sulfatierungs-Konsensus-Signal (Huttner 1987) (s. Abschn. I.5.2) umgeben ist, so daß die Sulfatreste an diesen Tyrosin-Resten lokalisiert sein müssten (Abb. 43).

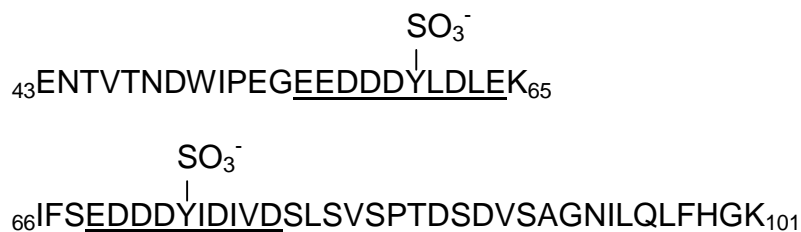


Abb. 43: Tryptische Peptide von HCII aus humanem Plasma und CHO-Zellen, die mit Hilfe der ESI-MS auf Sulfat-Reste untersucht wurden. Die typische Sequenz für Tyrosin-Sulfatierung (unterstrichen) und die wahrscheinliche Position der mit ESI-MS nachgewiesenen Sulfatierung ist angegeben.

3 HCII-Bindung an extrazelluläre Matrix

Die Glykosaminoglykane (GAGs) Heparansulfat und Dermatanulfat sind Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM). Das Ziel der Versuche war der Nachweis einer Bindung von HCII an diese GAG-Bestandteile der ECM. Zunächst wurde ein Modell-System (DASS-Methode, s. Abschn. II.4.5) mit Heparin-Sepharose-Partikeln verwendet, um die fluoreszenzmikroskopischen *in situ*-Nachweismethoden zu etablieren.

3.1 Heparin-Sepharose als Modell für die extrazelluläre Matrix

Als Modell dienten die Partikel der Heparin-Sepharose CL6B (Durchmesser 45-165 μm), wobei die an quervernetzte Agarose gekoppelten Heparin-Moleküle die Bindungsstellen für HCII repräsentierten. HCII wurde mit zwei Methoden fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen: a) indirekt mit Immunfluoreszenz und b) direkt als FITC-markiertes Molekül.

3.1.1 Immunfluoreszenz-Nachweis von Plasma-HCII

Zunächst wurde versucht, Plasma-HCII auf Heparin-Sepharose-Partikeln bei physiologischer Ionenstärke immunologisch zu detektieren. Eine Bindung von Plasma-HCII war unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht nachzuweisen. Als Ursache kam die Ionenstärke des eingesetzten PBS-Puffers in Betracht, da PBS neben den puffernden Phosphatsalzen hauptsächlich NaCl (137 mM) enthält.

Betrachtet man das Elutionsverhalten von Plasma-HCII in der Affinitätschromatographie von der verwendeten Heparin-Sepharose CL-6B, stellt man bereits ab einer NaCl-Konzentration von 100 mM NaCl (Abb. 44) eine HCII-Elution fest.

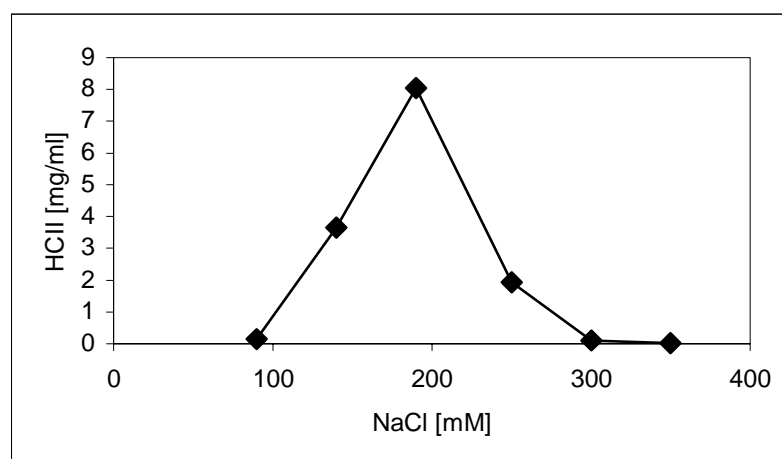


Abb. 44: Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie von Plasma-HCII. Humanes Plasma wurde mit PEG/BaCl₂ gefällt und das in TCE-Puffer (s. Abschnitt II.3.1) gelöste Pellet auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen (50 mM Tris-HCl, pH7,4) erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten von 0 - 1 M NaCl in 50 mM Tris-HCl pH 7,4. Die HCII-Konzentration in den Elutionsfraktionen wurde mit ELISA bestimmt.

Offenbar findet bei der Immunfluoreszenz-Präparation (vgl. Abschnitt II.4.6.3) während der einstündigen Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern eine durch die Ionenstärke des PBS-Puffers bedingte HCII-Ablösung von Heparin statt.

Um eine dauerhaftere Bindung von Plasma-HCII zu erzielen, wurde daraufhin versucht, einen Immunfluoreszenz-Nachweis in NaCl-freiem 20 mM Phosphat-Puffer zu erreichen (Methode s. Abschnitt II.4.5). Abbildung 45 zeigt ein deutliches Fluoreszenz-Signal der Heparin-Sepharose-Partikel. Allerdings ist kein Unterschied in dem Fluoreszenz-Signal zwischen einer Probe mit (Abb. 45b) und ohne HCII (Abb. 45a) zu erkennen. Der Primärantikörper zeigte eine ausgeprägte unspezifische Bindung, da dessen Abwesenheit zu einer deutlich geringeren Fluoreszenz führt (Abb. 45c). Die restliche Fluoreszenz ohne Primärantikörper (Abb. 45c) weist auf die unspezifische Bindung des DTAF-gekoppelten Sekundärantikörpers hin.

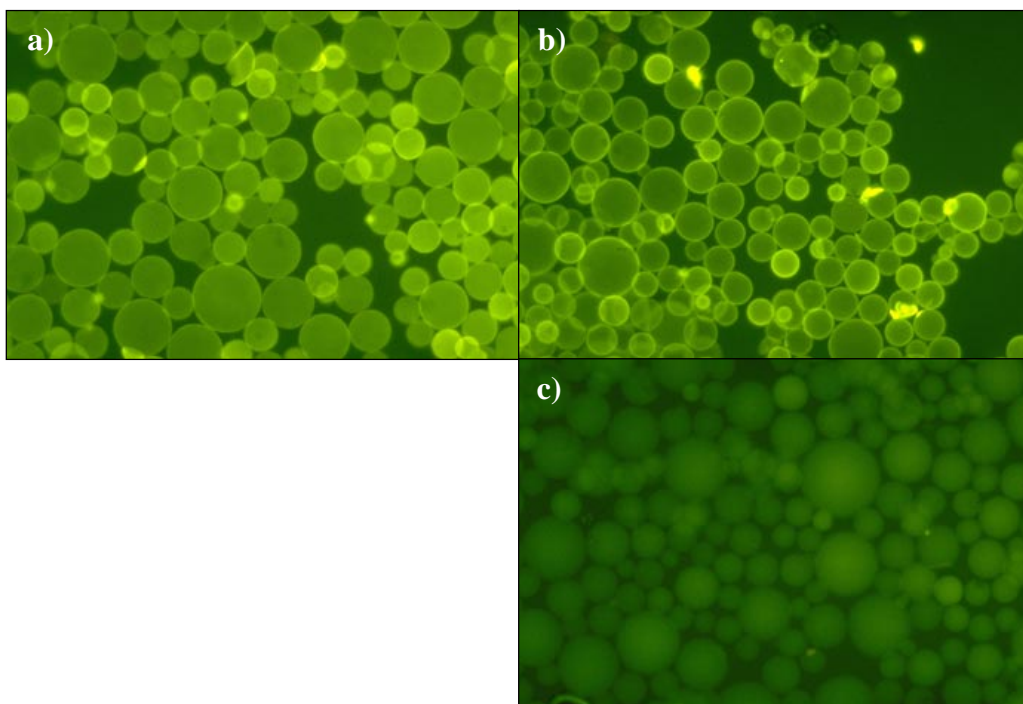


Abb. 45: Heparin-Sepharose-Partikel. Immunfluoreszenz-Nachweis von HCII in NaCl-freiem Phosphatpuffer. **a:** ohne HCII; **b:** mit HCII; **c:** ohne HCII und 1. Antikörper. (10 x Objektiv)

Unter diesen Bedingungen mit geringer Ionenstärke gelang der Nachweis mit Antikörpern nicht, da offensichtlich beide Antikörper unspezifisch an die Heparin-Sepharose banden. Der Grund für die unspezifische Bindung ist wahrscheinlich die ionische Wechselwirkung zwischen geladenen Gruppen des Antikörpers mit den negativen Ladungen des Heparins.

3.1.2 Fluoreszenz-Nachweis von FITC-HCII

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wurde kovalent an gereinigtes Plasma-HCII gekoppelt, so daß für den *in-situ*-Nachweis keine zusätzlichen Antikörper mit den damit verbundenen Problemen bei niedrigen NaCl-Konzentrationen erforderlich waren.

Zunächst konnte gezeigt werden, daß die NaCl-abhängige Bindung von HCII an Heparin auch in der Fluoreszenzmikroskopie deutlich wurde. Bereits bei einer NaCl-Konzentration von 50 mM war eine deutlich geringere Bindung von FITC-HCII an Heparin-Sepharose zu erkennen (Abb. 46). Bei höheren NaCl-Konzentrationen steigerte sich dieser Effekt, so daß bei 150 mM kein Fluoreszenzsignal mehr zu erkennen war. Für den Nachweis der Spezifität der Bindung wurde FITC-HCII in Gegenwart von Heparin als kompetitiven Liganden inkubiert (Abb. 47). Bei 0,1 mg/ml Heparin konnte eine partielle Entfärbung der Heparin-Sepharose-Partikel beobachtet werden. Bei 1,0 mg/ml Heparin war fast keine Fluoreszenz mehr sichtbar. Kontrollversuche mit zu diesem Zweck hergestellten FITC-BSA zeigten unter den gewählten NaCl-freien Bedingungen keine Bindung an Heparin-Sepharose (o. Abb.).

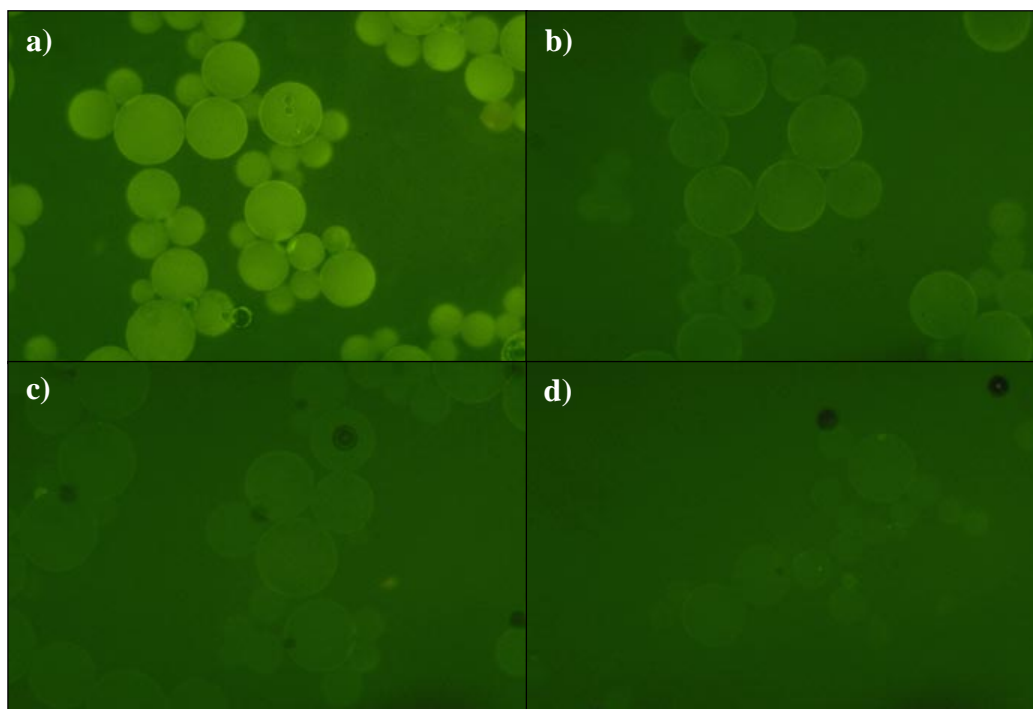


Abb. 46: NaCl-Abhängigkeit der Bindung von FITC-HCII an Heparin-Sepharose-Partikel. Heparin-Sepharose-Partikel mit gebundenem HCII wurden mit 20 mM Phosphatpuffer mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen jeweils fünf mal für 5 min gewaschen. **a:** 0 M NaCl; **b:** 0,05 M NaCl; **c:** 0,1 M NaCl; **d:** 0,15 M NaCl. (10 x Objektiv)

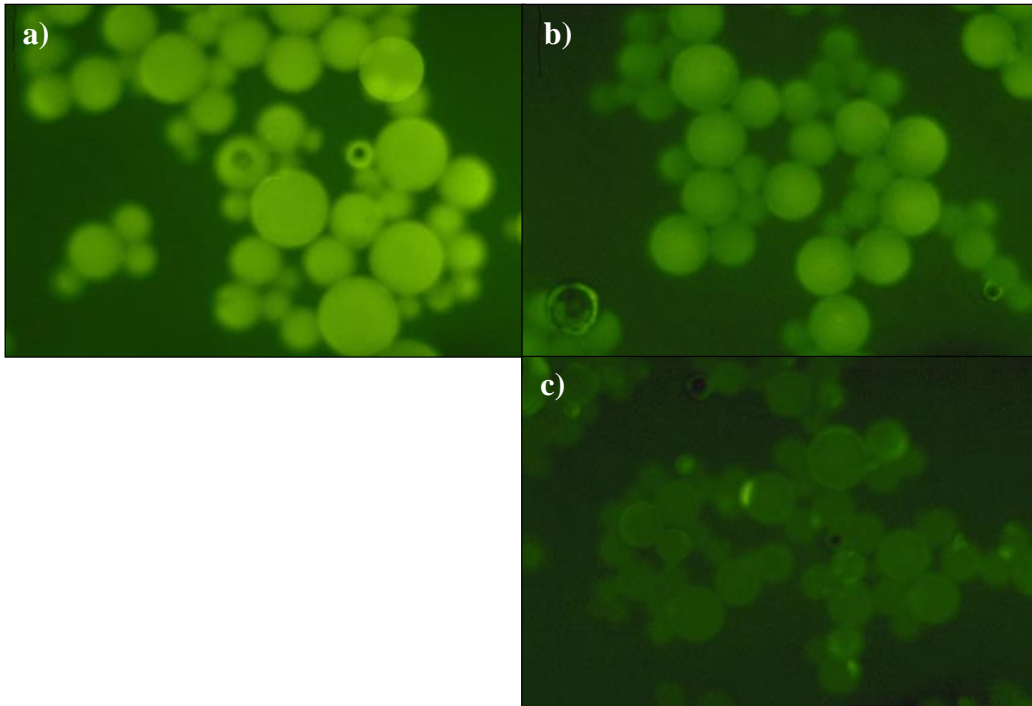


Abb. 47: Hemmung der Bindung von FITC-HCII an Heparin-Sepharose-Partikel in NaCl-freiem Phosphatpuffer in Gegenwart unterschiedlicher Heparin-Konzentrationen. **a:** 0 mg/ml Heparin; **b:** 0,1 mg/ml Heparin; **c:** 1,0 mg/ml Heparin. (10 x Objektiv)

3.2 Präparation von extrazellulärer Matrix

Zur Freilegung der ECM wurden verschiedene als Monolayer wachsende Zelllinien (A549, IMR-90, BAEC) mit 0,5 % Triton X-100 sowie mit einer Kombination aus 0,5% Triton X-100 und 20 mM NH_4OH inkubiert (s. Abschnitt II.4.6.2). Eine Behandlung lediglich mit 0,5% Triton löste die Zellkerne nicht von der Unterlage ab. Entgegen den Angaben in der Literatur ließen sich die Zellkerne nicht einfach abwaschen oder abpipettieren, sondern blieben überwiegend an der Unterlage fixiert. Im Lichtmikroskop ließen sich die Zellkerne bzw. deren Reste gut erkennen (Abb. 48 c) und durch DAPI-Färbung nachweisen (Abb. 48 a), während sich die sie fixierenden Cytoskelettbestandteile nicht identifizieren ließen. Letztere waren aber wohl vorhanden, da sie den Zellkern umgeben und an dessen Fixierung an der Unterlage beteiligt sind (Alberts *et al.* 1994).

Durch die Behandlung mit DNase I konnte die DNA des Zellkerns vollständig abgebaut werden (Abb. 48a,b), so daß sie durch den DNA-bindenden Farbstoff DAPI nicht mehr anfärbbar war. Zurück blieben granuläre Strukturen, bei denen es sich um die Reste von Nucleoli handeln könnte (Abb. 48d).

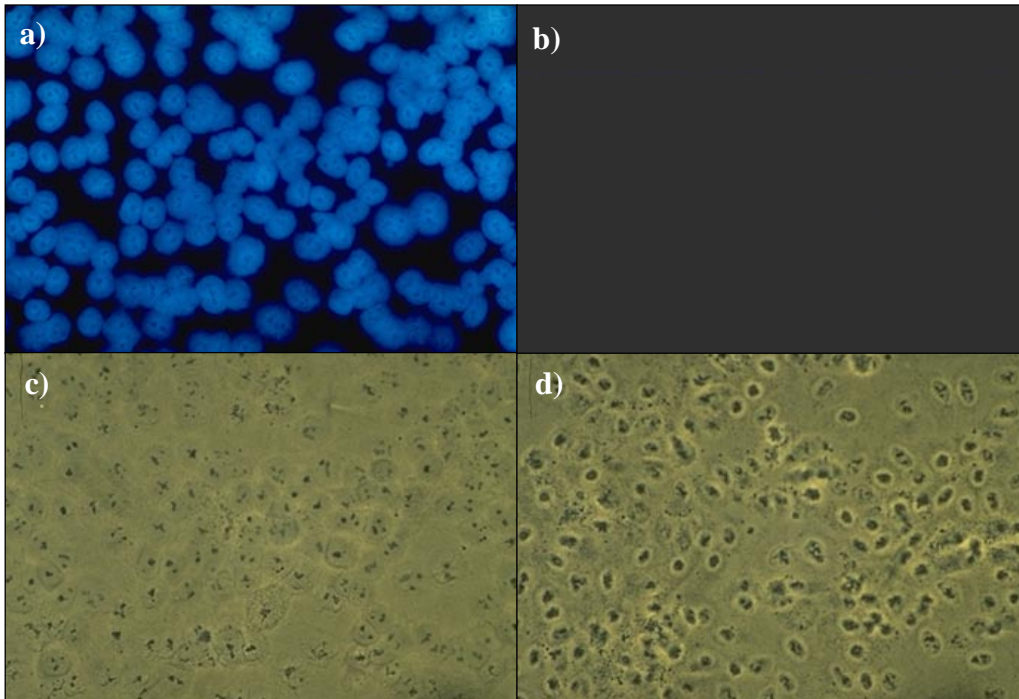


Abb. 48: ECM-Präparation von A549-Zellen. **a, c:** Inkubation mit 0,5 % Triton, 15 min RT; **b, d:** Inkubation mit 0,5 % Triton 15 min RT und DNase I, 1 h; **a, b:** DAPI-Färbung; **c, d:** Durchlichtaufnahmen zu a, b. (40 x Objektiv)

Abbildung 49 zeigt die Unterschiede zwischen der ECM-Präparation mit und ohne 20 mM NH_4OH . Durch NH_4OH -Zusatz während der ECM-Präparation lösten sich die Zellkerne auf, hinterließen jedoch DNA-Reste, die sich nicht vollständig entfernen ließen. Mit Hilfe der DAPI-Färbung ließen sich diese nachweisen (Abb. 49b). Durch die Ammoniumhydroxid-Behandlung lösten sich die Kernstrukturen vollständig auf, wobei allerdings fibrilläre DNA-Reste übrigblieben. Dagegen stellen die im Durchlicht (Abb 49f) zu erkennenden fibrillären Strukturen ECM dar. Der Vergleich von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen der NH_4OH -präparierten ECM (Abb. 49b,d,f) zeigt, daß die ECM-Strukturen auch DNA enthielten.

In der Literatur fanden sich keine Hinweise auf DNA-Reste bei der Präparation mit Triton X-100/ NH_4OH , die je nach Fragestellung stören könnten. Für die Untersuchung der HCII-Bindung an ECM war es jedoch wichtig, die DNA vollständig zu entfernen, da DNA als Polyanion eine Affinität zu HCII hat (Pratt *et al.* 1989).

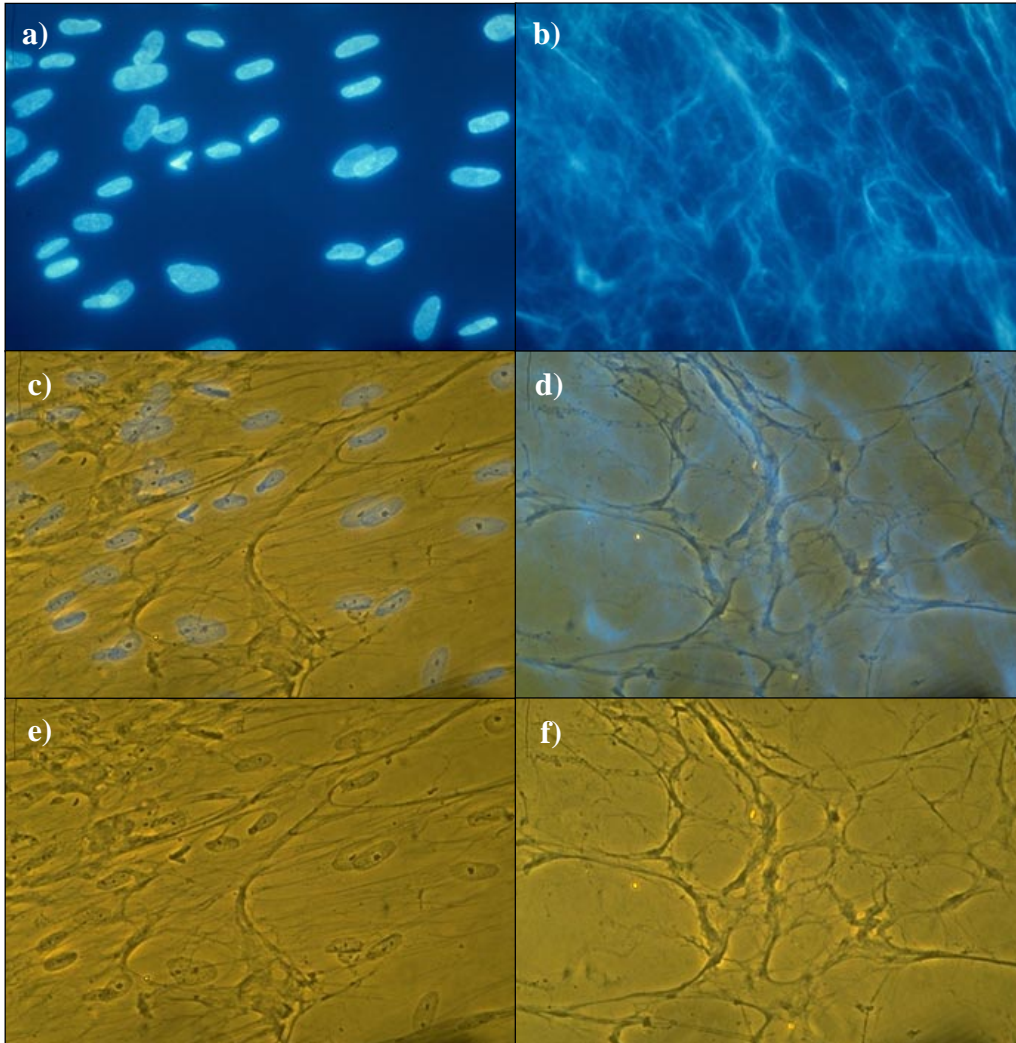


Abb. 49: ECM-Präparation von IMR-90-Zellen mit Triton/ NH_4OH .
a, c, e: Präparation mit 0,5 % Triton; **b, d, f:** Präparation mit 0,5 % Triton/20 mM NH_4OH . **a+b:** DAPI-Färbung;
c+d: DAPI-Färbung/Durchlicht; **e+f:** Durchlicht. (40 x Objektiv)

3.3 Bindung von Plasma-HCII an extrazelluläre Matrix

Die zunächst durchgeführten Versuche, Plasma-HCII bei physiologischer Ionenstärke (PBS) auf den GAGs der ECM mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen, waren negativ (nicht gezeigt).

In weiteren Versuchen wurde kovalent mit FITC markiertes Plasma-HCII bei verringerter Ionenstärke verwendet, um fluoreszenzmikroskopisch eine Bindung an die ECM nachzuweisen (s. Abschnitt II.4.6.4).

In NaCl-freiem Phosphatpuffer konnte eine Bindung von FITC-HCII an ECM-Präparate belegt werden (Abb. 50a,c). Die Anfärbung der DNA mit DAPI zeigte jedoch, daß FITC-HCII auch an Strukturen band, die DNA enthielten (Abb. 50b,d). Bei niedriger Ionenstärke war daher keine spezifische Bindung von HCII an GAGs zu erzielen.

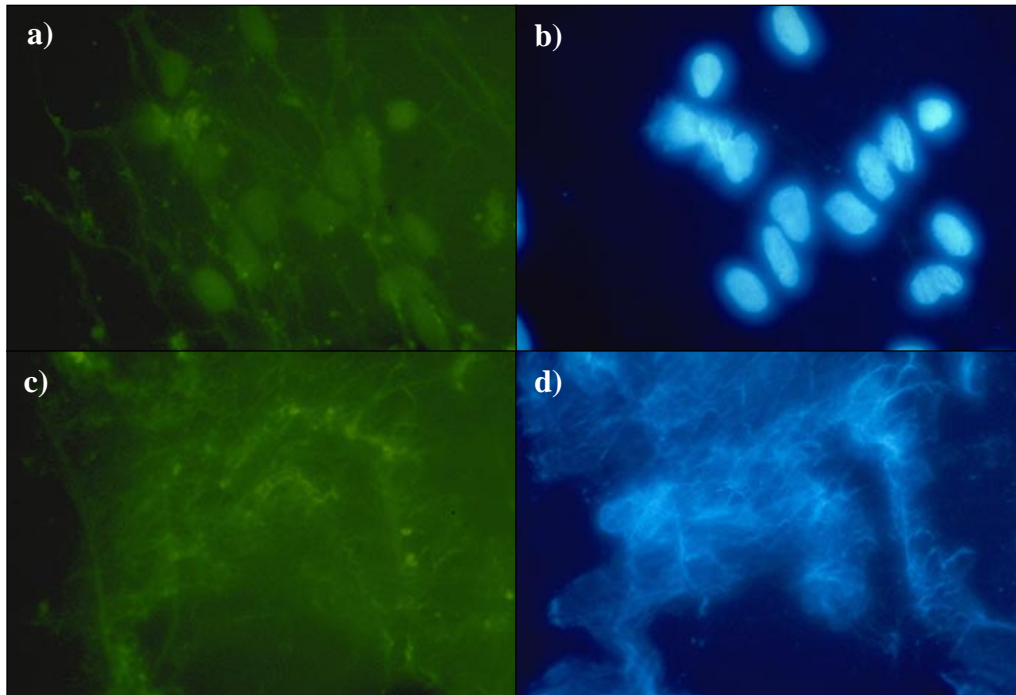


Abb. 50: Bindung von FITC-markiertem HCII an die ECM von IMR 90-Zellen in NaCl-freiem Phosphatpuffer. **a+b:** ECM-Präparation mit 0,5% Triton; **c+d:** ECM-Präparation mit 0,5 % Triton/NH₄OH; **a+c:** FITC-Fluoreszenz (FITC-HCII); **b+d:** Dapi-Färbung zu a bzw. c. (40 x Objektiv)

3.4 Bindung von HCII Δ 51-76 an extrazelluläre Matrix

HCII Δ 51-76 wurde rekombinant hergestellt (s. Abschnitt III.1.5.3), um Strukturen in der ECM aufzufinden, die an die GAG-Bindungsstelle von HCII binden. Der Deletionsmutante HCII Δ 51-76 fehlt die saure Domäne des N-Terminus, die beim Wildtyp-HCII mit GAGs um die Bindungsstelle konkurriert. Durch die Deletion ist die Heparin-Affinität von HCII deutlich höher (s. Abschn. III.5.2), so daß eine ausreichend feste Bindung für den *in situ*-Immunfluoreszenznachweis bei physiologischer Ionenstärke zu erwarten war.

Bei diesen Versuchen wurden ECM-Präparate von Endothelzellen aus Rinderaorten eingesetzt. Für den Nachweis, daß es sich um eine spezifische Bindung der GAG-Bindungsstelle von HCII Δ 51-76 handelte, wurde HCII Δ 51-76 mit ansteigenden Konzentrationen von Dermatansulfat inkubiert (s. Abschn. II.4.6.3). In Abbildung 51 a) und b) ist das Immunfluoreszenz-Signal ohne bzw. mit HCII Δ 51-76 zu sehen. Bei physiologischer Ionenstärke des PBS-Puffers sind nur schwache und unspezifische Signale durch Primär- und Sekundärantikörper zu erkennen (Abb. 51a). Wurde hingegen mit HCII Δ 51-76 vorinkubiert, ist ein intensives Fluoreszenzsignal zu beobachten (Abb. 51b). Bei gleichzeitiger Inkubation von HCII und Dermatansulfat verschwand das Fluoreszenzsignal bei einer Dermatansulfatkonzentration von 100 μ g/ml (Abb. 51c,d). Es muß daher davon ausgegangen werden, daß durch das lösliche Dermatansulfat die GAG-Bindungsstelle des HCII Δ 51-76 kompetitiv abgesättigt bzw. gehemmt wurde.

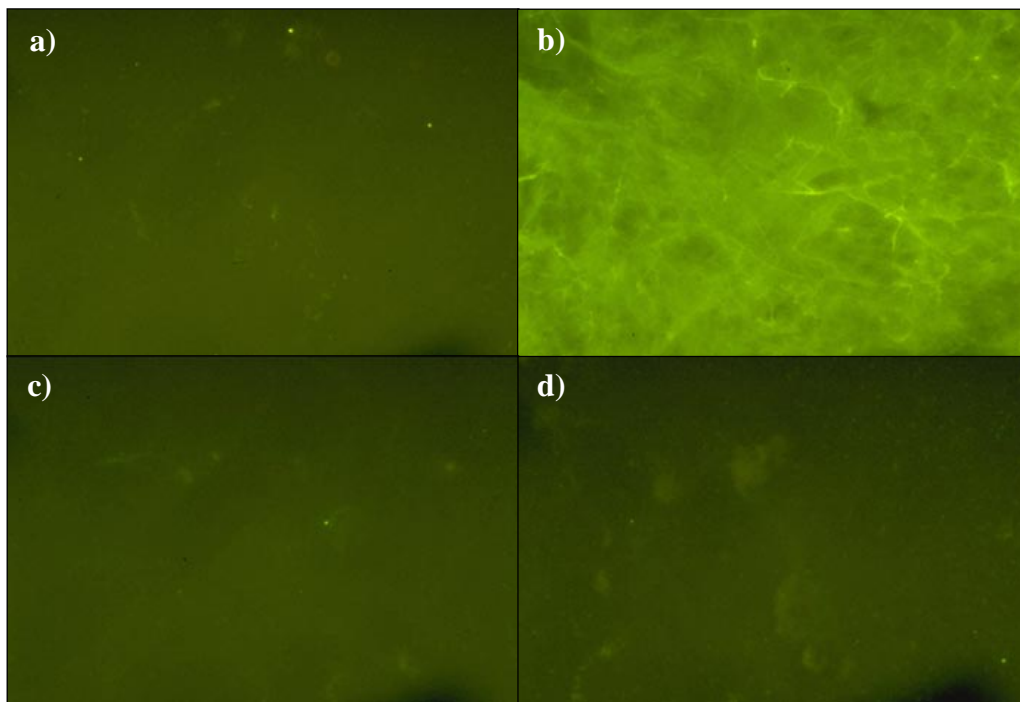


Abb. 51: Immunfluoreszenznachweis der spezifischen Bindung von HCII Δ 51-76 bei physiologischer Ionenstärke (PBS) an die ECM von BAEC-Zellen. Die Präparation der ECM wurde mit 0,5% Triton/NH₄OH durchgeführt. **a:** ohne HCII Δ 51-76; **b-d:** mit HCII Δ 51-76; **b:** ohne Dermatansulfat; **c:** HCII Δ 51-76 und 0,1 mg/ml Dermatansulfat; **d:** HCII Δ 51-76 1,0 mg/ml Dermatansulfat. (40 x Objektiv)

4 Glykosaminoglykan-Bindung von HCII, AT und deren Thrombin-Komplexe

Die Eigenschaft von HCII, an Heparin und andere Glykosaminoglykane (GAGs) zu binden, steht im Zusammenhang mit der in weiten Teilen noch ungeklärten Physiologie dieses Thrombin-Inhibitors. Auch viele Details des Inhibitions-Mechanismus sind nicht vollständig aufgeklärt.

Deshalb schien es lohnend, das Bindungsverhalten von Thrombin-HCII-Komplexen (THCII) und der Einzelkomponenten HCII und Thrombin an GAGs zu vergleichen. Vergleichend wurde die Methode auch mit Antithrombin (AT), Thrombin und deren Komplexen (TAT) angewendet. Die Bestimmung der ionenstärkeabhängigen Bindungsaffinität erfolgte mit den GAGs Heparin und Dermatansulfat. Als Maß für die Affinität diente die NaCl-Konzentration, bei der eine Elution von Säulen mit immobilisiertem Heparin bzw. Dermatansulfat erfolgte.

Die Thrombin-Inhibitor-Komplexbildung geschah in Abwesenheit von aktivierenden GAGs. Es wurden dazu equimolare Mengen von Inhibitor (HCII bzw. AT) und Thrombin – wie in Abschnitt II.5.3.2 beschrieben – inkubiert und anschließend verbleibendes nicht komplexiertes Thrombin durch den niedermolekularen Serin-Protease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) blockiert.

Der lineare NaCl-Gradient der Elution war so ausgelegt, daß die NaCl-Konzentration je Fraktion um 50 mM (bzw. um 100 mM bei den Versuchen mit AT) anstieg. Die NaCl-Konzentration in den Fraktionen wurde mit dem Leitfähigkeitsmonitor der FPLC-Anlage bestimmt.

Die Analyse der Proteine in den Elutionsfraktionen erfolgte mit einem bispezifischen Western-Blot, so daß jeweils alle drei Komponenten (Thrombin, Serpin, sowie der Thrombin-Serpin-Komplex) gleichzeitig nachgewiesen werden konnten. Da durch die PAGE des Western-Blots die Trennung der Proteine nach ihrer Molmasse erfolgte, konnte dadurch auch die Integrität der eluierten Proteine beurteilt werden. Dies war wichtig, da die Inhibitoren HCII und AT zwar Komplexe mit Thrombin bilden, aber die Möglichkeit der Bildung von proteolytischen Spaltprodukten durch die Protease Thrombin bestand.

4.1 Affinität von HCII, AT sowie deren Thrombin-Komplexe zu Heparin

Die Elution von gereinigtem Plasma-HCII erfolgte unter den gewählten Bedingungen von der Heparin-Sepharose-Säule bei 180–280 mM NaCl, wobei ein kleiner Anteil erst bei 330 mM NaCl eluierte (Abb. 52). Das Maximum der HCII-Elution lag bei dem gezeigten Western-Blot bei der 230 mM-Fraktion. Der Mittelwert aus fünf Versuchen betrug 210 mM NaCl (Tab. 15). Der Komplex aus HCII und Thrombin (THCII) eluierte deutlich später mit einem Maximum bei 330 bis 380 mM NaCl. Die Thrombin-Elution erfolgte zwischen 430 und 530 mM NaCl, wobei sich das meiste Thrombin in der 480 mM-Fraktion befand (Abb. 52).

Dieses unterschiedliche Elutionsverhalten zeigt, daß die Heparinbindungsstelle des Komplexes nicht identisch mit einer der Bindungsstellen der unkomplexierten Proteine sein kann. Die

Komplexierung von HCII und Thrombin muß demnach Auswirkungen auf die Konformationen oder die sterische Zugänglichkeit der Bindungsstellen haben.

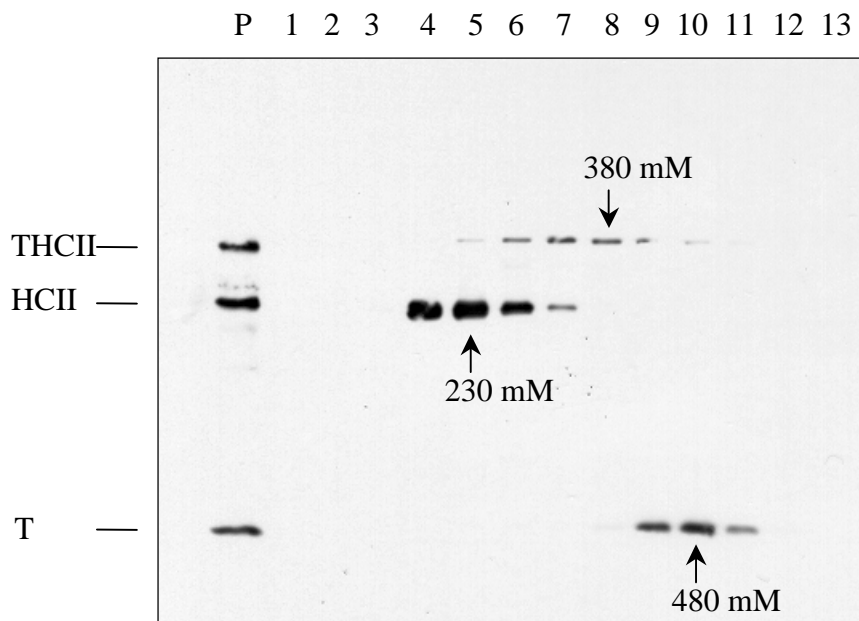


Abb. 52: Fraktionierung von HCII, Thrombin (T) und deren Komplex (THCII). Die HCII/Thrombin-Komplexierungsansätze wurden auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten und der Nachweis der Komponenten mit einem bispezifischen Western-Blot (anti-Thrombin und anti-HCII). Pfeile: NaCl-Konzentration der jeweiligen Elutions-Fraktion. P: Probe vor der Fraktionierung. Spur 1-13: Elutionsfraktionen mit je 50 mM NaCl ansteigender NaCl-Konzentration.

Unter vergleichbaren Bedingungen wurde auch die Affinität von AT und dessen Thrombin-komplex TAT für Heparin gemessen. In Abbildung 53 ist zu sehen, daß AT über einen weiten Bereich zwischen 470 und 1070 mM NaCl eluierte. Der Komplex aus AT und Thrombin eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 370 bis 570 mM mit einem Maximum bei 470 mM NaCl. Das Maximum der Thrombin-Elution bei 470 mM NaCl war vergleichbar mit dem THCII-Versuch (Abb. 52).

Von AT kommen im Blutplasma zwei Varianten vor: 90 % des AT ist mit vier N-Glykanen vollständig glykosyliert, eluiert bei 0,9 M NaCl und wird als AT_{α} bezeichnet. AT_{β} fehlt ein N-Glykan am Asparagin 135 und eluiert bei 1,4 M NaCl von Heparin-Sepharose (Peterson & Blackburn 1985, Brennan *et al.* 1987, Picard *et al.* 1995). Das verwendete kommerziell erhältliche AT bestand offensichtlich überwiegend aus AT_{α} , da ein zweiter Elutions-Peak bei höherer NaCl-Konzentration nicht beobachtet wurde.

Der TAT-Komplex bindet deutlich schwächer als freies AT, was sich in Übereinstimmung mit der Literatur befindet (Carlström *et al.* 1977, Beeler *et al.* 1979).

Der TAT-Komplex zeigte das gleiche Elutionsverhalten wie Thrombin. Aus diesem Befund läßt sich jedoch nicht unbedingt der Schluß ziehen, daß die Bindung des Komplexes ausschließlich über die Heparin-Bindungsstelle des Thrombins erfolgt (s. Abschnitt IV.4)

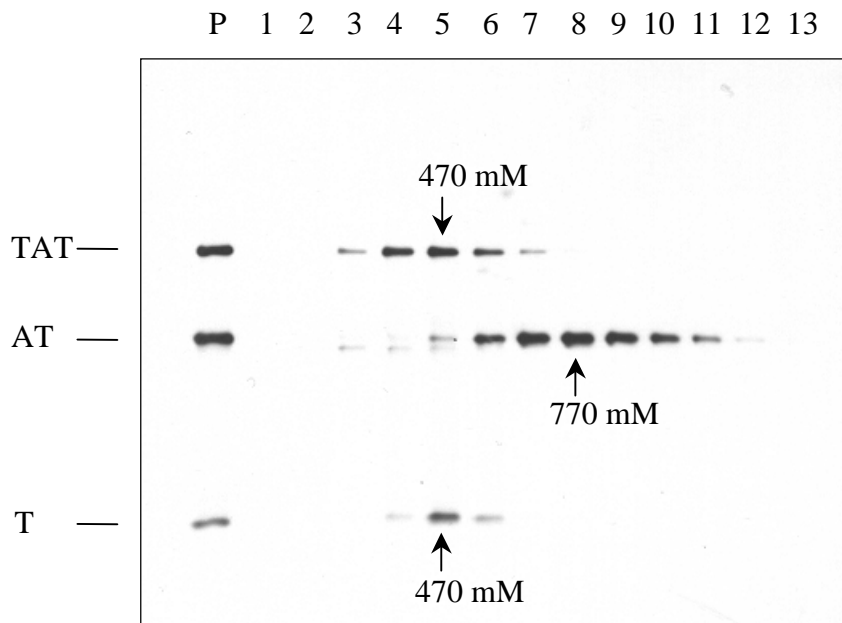


Abb. 53: Fraktionierung von AT, Thrombin (T) und deren Komplex (TAT).

Die AT/Thrombin-Komplexierungsansätze wurden auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten und der Nachweis der Komponenten mit einem bispezifischen Western-Blot (anti-Thrombin und anti-AT). Pfeile: NaCl-Konzentration der jeweiligen Elutions-Fraktion. P: Probe vor der Fraktionierung. Spur 1-13: Elutionsfraktionen mit je 100 mM NaCl ansteigender NaCl-Konzentration.

Vergleicht man die ermittelten Heparin-Affinitäten mit den entsprechenden Literaturdaten, findet man überwiegende Übereinstimmung bei den Werten für HCII, AT, TAT und Thrombin (Tab. 15). Die Elution des THCII-Komplexes von Heparin-Sepharose wurde bisher noch nicht untersucht bzw. veröffentlicht. Maekawa und Tollefsen (1996) verwendeten zwar Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie um HCII und THCII zu trennen, machten aber keine Angaben zur NaCl-Konzentration der jeweiligen Elutionsfraktionen.

Die auftretenden Differenzen zu den Literaturdaten können auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückgeführt werden. Bei Pratt *et al.* (1992) wurde neben der Heparin-Sepharose CL-6B auch noch eine andere Heparin-Agarose-Matrix verwendet, bei der sich ein deutlich abweichendes Elutionsverhalten von HCII und AT zeigte. Als weitere abweichende Versuchsbedingungen kommen Temperatur, lineare Flußgeschwindigkeit, Pufferzusammensetzung oder Form des NaCl-Gradienten (Stufen oder linear) in Frage.

Tab. 15: Vergleich der mit Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie (HS-AC) ermittelten NaCl-Elutionswerte von humanem HCII, AT und deren Thrombin-Komplexe mit Literaturdaten.

Protein	HS-AC NaCl [M]	Lit.-Werte NaCl [M]	Ref.
HCII	0,21	0,15	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
		0,18	Liaw <i>et al.</i> 1999
		0,37* + 0,22*	Pratt <i>et al.</i> 1992
		0,40	Gettins <i>et al.</i> 1996
THCII	0,34	-	-
AT	0,77	0,8**	Carlström <i>et al.</i> ,1977
		0,93* + 0,75*	Pratt <i>et al.</i> 1992
		0,9	Gettins <i>et al.</i> 1996
		AT _α : 0,9-1,0	Peterson & Blackburn 1985
		AT _β : 1,4	Peterson & Blackburn 1985
TAT	0,47	0,5 M **	Carlström <i>et al.</i> 1977
T	0,48	0,5-0,6	Ding & Xu 1995
		0,6	Phillips <i>et al.</i> 1993
		0,64	Pratt & Church 1992
		0,65	Han & Tollefsen 1998

* Werte wurden mit verschiedenen Heparin-Affinitätschromatographie-Matrizes ermittelt

** Rinder-AT und -Thrombin

4.2 Affinität von HCII, AT sowie deren Thrombin-Komplexe zu Dermatansulfat

Dermatansulfat ist ein GAG, das bevorzugt die HCII-Thrombin-Reaktion katalysiert, jedoch nicht in der Lage ist, die AT-Thrombin-Inhibition zu beschleunigen.

HCII eluierte unter den gewählten Bedingungen von DS-Agarose bei 110-160 mM NaCl (Abb. 54). Auch der THCII-Komplex zeigte eine vergleichbare Affinität, da er ebenfalls bei 110-160 mM NaCl eluierte. Thrombin band etwas fester und eluierte erst bei 210-260 mM NaCl. Der Komplex zeigt also eine mit HCII vergleichbare Affinität, die jedoch geringer ist als die von Thrombin.

Dermatansulfat und Heparin binden an Thrombin über die anionenbindende Exosite II, die allerdings für den eigentlichen Inhibitions-Mechanismus mit HCII kaum (Heparin) oder gar nicht (Dermatansulfat) benötigt wird (Sheehan *et al.* 1994).

Da der THCII-Komplex schwächer an Dermatansulfat bindet als Thrombin, scheint dessen Exosite II infolge der Komplexbildung an Affinität zu verlieren. Auch eine alleinige oder zusätzliche Bindung über die GAG-Bindungsstelle von HCII kommt in Frage.

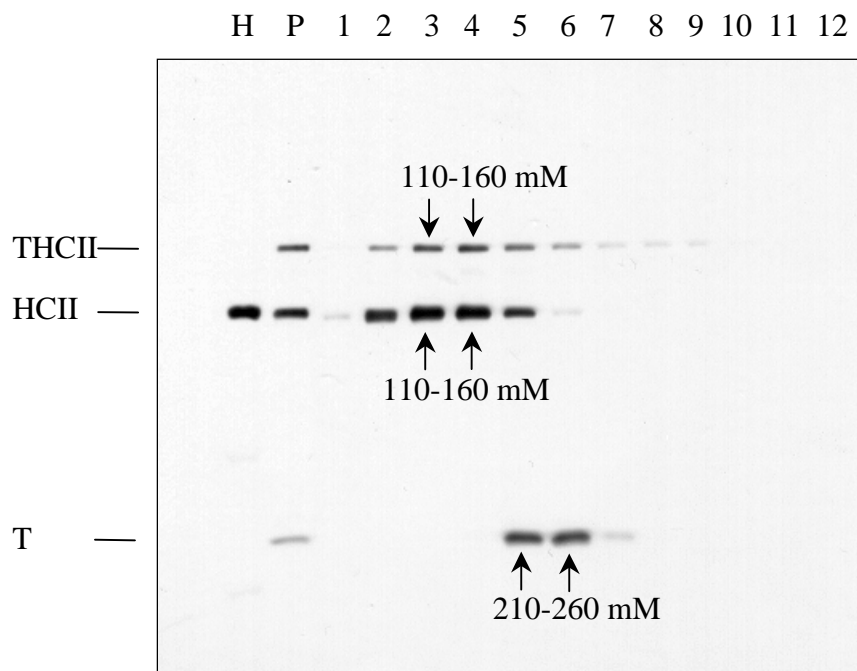


Abb. 54: Fraktionierung von HCII, Thrombin (T) und deren Komplex (THCII).

Die HCII/Thrombin-Komplexierungsansätze wurden auf eine Dermatansulfat-Agarose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten und der Nachweis der Komponenten mit einem bispezifischen Western-Blot (anti-Thrombin und anti-HCII). Pfeile: NaCl-Konzentration der jeweiligen Elutions-Fraktion. H: gereinigtes Plasma HCII; P: Probe vor der Fraktionierung. Spur 1-12: Elutionsfraktionen mit je 50 mM NaCl ansteigender NaCl-Konzentration.

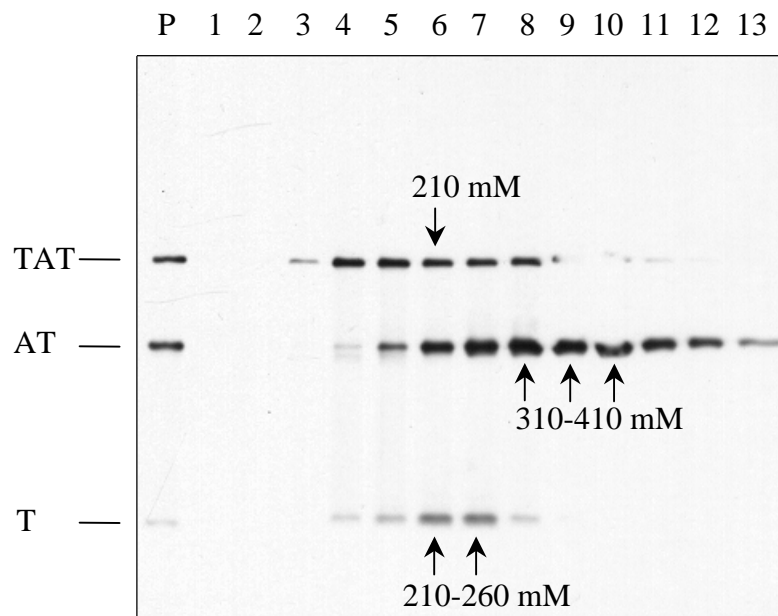


Abb. 55: Fraktionierung von AT, Thrombin (T) und deren Komplex (TAT).

Die AT/Thrombin-Komplexierungsansätze wurden auf eine Dermatansulfat-Agarose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten und der Nachweis der Komponenten mit einem bispezifischen Western-Blot (anti-Thrombin und anti-AT). Pfeile: NaCl-Konzentration der jeweiligen Elutions-Fraktion. P: Probe vor der Fraktionierung. Spur 1-13: Elutionsfraktionen mit je 50 mM NaCl ansteigender NaCl-Konzentration.

Das Elutionsverhalten von AT und dessen Thrombin-Komplex zeigt Abb. 55. AT eluierte über einen breiten Ionenstärkebereich mit einem Schwerpunkt bei 310 bis 410 mM NaCl. Der TAT-Komplex eluierte bereits bei einer niedrigeren NaCl-Konzentration um 210 mM NaCl. Auch Thrombin befand sich in den Fraktionen mit dieser NaCl-Konzentration. TAT und Thrombin besitzen demnach eine vergleichbare Affinität zu der verwendeten Dermatansulfat-Matrix. Dies könnte auf eine Dermatansulfat-Bindung des Komplexes über Thrombin hinweisen, die beim unkomplexierten Thrombin über Exosite II erfolgt (Sheehan *et al.* 1994).

Vergleicht man die ermittelten Werte mit entsprechenden Literaturdaten (Tab. 16), so lassen sich Diskrepanzen feststellen. Als Ursache spielt sicher die Methodik eine Rolle, da außer bei Sheehan *et al.* (1994) immobilisiertes HCII und AT anstatt Dermatansulfat als Affinitäts-Matrix verwendet wurde. Auch die Herkunft des Dermatansulfats hat einen Einfluß, wie Versuche bei Sinniger *et al.* (1993) zeigten. Die gemessene hohe Affinität von AT zu Dermatansulfat steht im Widerspruch zur Literatur und könnte ein Artefakt darstellen. Als Ursache läßt sich eine Verunreinigung der Dermatansulfat-Agarose mit Heparin nicht ausschließen. Das Dermatansulfat-Ausgangsmaterial für die Kopplung wurde nicht mit salpetriger Säure behandelt (Teien *et al.* 1976), um eine mögliche Verunreinigung mit Heparin abzubauen. Auch übersulfatiertes DS zeigt eine gewisse Affinität zu AT (Sinniger *et al.* 1993). Für die Interpretation der Daten sind neben den absoluten Werten besonders die relativen Unterschiede in der Affinität zu den GAGs wichtig.

Der Vergleich der GAG-Affinitäten von HCII und AT mit der Affinität der jeweiligen Komplexe läßt Rückschlüsse auf die jeweilige GAG-Bindungsstelle zu. Dies wird in Abschnitt IV.4 diskutiert.

Tab. 16: Vergleich der mit Dermatansulfat-Agarose-Affinitätschromatographie (DS-AC) ermittelten NaCl-Elutionswerte von humanem HCII, AT und deren Thrombinkomplexe mit Literaturdaten. Die Literaturwerte für HCII und AT wurden mit immobilisierten HCII bzw. AT ermittelt, wobei gebundenes Dermatansulfat mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert wurde.

Protein	DS-AC NaCl [M]	Lit.-Werte NaCl [M]	Ref.
HCII	0,14	0,25, 0,30** 0,3 0,3* 0,38* 0,37*	Maimone & Tollefsen 1990 Tollefsen <i>et al.</i> 1986 Sinniger <i>et al.</i> 1993
THCII	0,14	-	-
AT	0,36	< 0,15	Sinniger <i>et al.</i> 1993
TAT	0,24	-	-
T	0,24	0,24	Sheehan <i>et al.</i> 1994

* je nach DS-Herkunft

** hochaffine Hexasaccharide

Ein Kontrollversuch sollte zeigen, ob sich das Elutionsverhalten von HCII und AT durch den Kontakt mit Thrombin während der Komplexierungsreaktion durch proteolytischen Verdau verändert hatte. Abbildung 56 zeigt das Elutionsverhalten von HCII- und AT-Präparaten, die

keinen Kontakt mit Thrombin hatten. Beide Proteine eluierten bei der gleichen NaCl-Konzentration wie HCII bzw. AT, das während der Komplexbildungsreaktion mit aktivem Thrombin inkubiert wurde. Thrombin scheint also unter den gewählten Komplexbildungsbedingungen das Elutionsverhalten von unkomplexierten HCII und AT nicht zu beeinflussen.

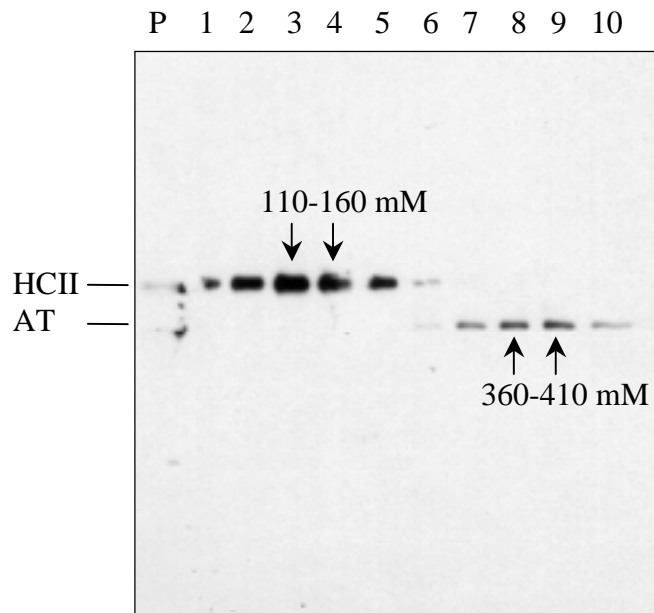


Abb. 56: Fraktionierung von HCII und AT, die nicht mit Thrombin inkubiert wurden. HCII und AT wurden auf eine Dermatansulfat-Agarose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten und der Nachweis der Komponenten mit einem bispezifischem Western-Blot (anti-HCII und anti-AT). Pfeile: NaCl-Konzentration der jeweiligen Elutions-Fraktion. P: Probe vor der Fraktionierung. Spur 1-10: Elutionsfraktionen mit je 50 mM NaCl ansteigender NaCl-Konzentration.

5 Heparin-Affinität von HCII-Varianten

Die Untersuchung der Heparin-Bindungseigenschaften von HCII-Varianten geschah vor dem Hintergrund, daß z.B. bei AT_{β} ein fehlendes N-Glykan zu einer erhöhten Heparin-Affinität führt (Brennan *et al.* 1987) und es Hinweise gibt, daß die Tyrosin-Sulfatierung von HCII die Heparin-Affinität herabsetzen könnte (Ragg *et al.* 1990a,b).

Verschiedene HCII-Varianten wurden hergestellt, um deren Heparin-Affinität mit Hilfe der Heparin-Affinitätschromatographie zu bestimmen. Diese HCII-Varianten waren geeignet, den Einfluß von posttranslationalen Modifikationen auf die Affinität gegenüber Heparin zu überprüfen.

Der Einfluß der N-Glykane von HCII auf die Heparin-Affinität ließ sich mit verschiedenen N-glykanfreien HCII-Varianten untersuchen. Die N-Glykosylierung wurde einerseits metabolisch durch die Inkubation HCII-produzierender Zellen (HepG2, CHO_{HCII}) mit dem N-Glykosylierungshemmer Tunicamycin unterdrückt. Andererseits konnte ebenfalls N-glykanfreies HCII durch die Expression von Wildtyp-HCII und der Deletionsmutante HCII Δ 51-76 in *E. coli* gewonnen werden, da *E. coli* keine Glykosylierungen durchführt (Baneux 1999).

HCII enthält als weitere, bisher nachgewiesene posttranslationale Modifikation zwei sulfatierte Tyrosin-Reste (Hortin *et al.* 1986). Auch zur Analyse der Proteinsulfatierung stand ein metabolischer Inhibitor zur Verfügung: Das Chlorat-Ion hemmt kompetitiv das Enzym Tyrosylprotein-Sulfotransferase (Baeuerle & Huttner 1986), so daß sulfatfreies, aber dennoch N-glykosyliertes HCII in CHO-Zellen produziert werden konnte.

5.1 Wildtyp-HCII aus *E. coli*

Hinsichtlich der HCII-Affinität zu Heparin gibt es deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp-HCII aus eukaryotischen und prokaryotischen Expressionssystemen.

Wildtyp-HCII wurde in der *AG Zelluläre Genetik* von F. Krepulat in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) exprimiert (Krepulat 1999). Einige Versuche zur Etablierung der Aufreinigung wurden zusammen mit F. Krepulat durchgeführt. Bei dem ersten Reinigungsschritt mit Heparin-Sepharose kam ein Stufengradient zum Einsatz, bei dem das Wildtyp-HCII aus *E. coli* zwischen 0,2 und 0,5 M NaCl eluierte (Krepulat 1999). Die in Vorversuchen mit einem linearen Gradienten ermittelte Elution lag bei 0,44 M NaCl.

In der Literatur sind übereinstimmend ebenfalls Werte um 0,4 M NaCl für die Elution zu finden (Tab. 17). Das in *E. coli* erzeugte Wildtyp-HCII besitzt eine deutlich höhere Affinität zu Heparin als Plasma-HCII, welches bei 0,21 M NaCl eluiert (s. Abschnitt III.3.1). Als Ursache kommen die von *E. coli* nicht ausgeführten posttranslationalen Modifikationen, insbesondere N-Glykosylierungen und Tyrosin-Sulfatierungen, in Frage.

Tab. 17: Heparin-Affinität von rekombinatem humanem Wildtyp-HCII aus *E. coli* (Literaturwerte).

NaCl [M]	Ref.
0,35	Blinder & Tollefsen 1990
0,36	Van Deerlin & Tollefsen 1991
0,38	Whinna <i>et al.</i> 1991
0,45	Han & Tollefsen 1998

5.2 HCII Δ 51-76 aus *E. coli*

Der HCII-Mutante HCII Δ 51-76 fehlt im N-terminalen Bereich eine saure Domäne, die nach dem Modell von Ragg *et al.* (1990a,b) mit der Heparinbindungsstelle von HCII wechselwirkt und durch Konkurrenz die Heparin-Affinität herabsetzt. Die Expression von HCII Δ 51-76 in *E. coli* BL21(DE3) wurde in Abschnitt III.1.4 beschrieben. Um die Heparin-Affinität zu bestimmen, wurde HCII Δ 51-76 mit einem linearen NaCl-Gradienten von Heparin-Sepharose eluiert. Der Mittelwert von mehreren Versuchen lag bei 860 mM NaCl (Abb. 57).

Diese hohe Affinität entsteht vermutlich dadurch, daß der N-Terminus nicht mehr an die Heparin-Bindungsstelle binden kann und diese dadurch für Heparin besser zugänglich ist. Wegen der fehlenden Konkurrenz zwischen Heparin und dem N-Terminus entspricht diese Affinität demnach der intrinsischen Affinität der GAG-Bindungsstelle zu Heparin.

N-terminale Deletionsmutanten (HCII- Δ 72, HCII- Δ 74) mit Deletionen der Aminosäurereste 1-72 bzw. 1-74 die ebenfalls in *E. coli* exprimiert wurden, zeigten eine vergleichbar hohe Affinität zu Heparin mit einer Elution bei 0,72-0,77 M NaCl (Van Deerlin & Tollefsen 1991). Dieser etwas niedrigere Wert der NaCl-Konzentration steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der etwas höheren Ionenstärke des bei van Deerlin & Tollefsen verwendeten Puffers, der 50 mM Tris-HCl Puffer enthielt. Bei dem in Abb. 57 beschriebenen Versuch waren lediglich 20 mM Tris-HCl im Puffer enthalten. Eine in BHK-Zellen erzeugte HCII- Δ 74 Deletionsmutante eluierte bei 700 mM NaCl von Heparin-Sepharose (Liaw *et al.* 1999). Dieses im eukaryotischen System hergestellte HCII dürfte glykosyliert sein und bindet vielleicht wegen der N-Glykane schwächer.

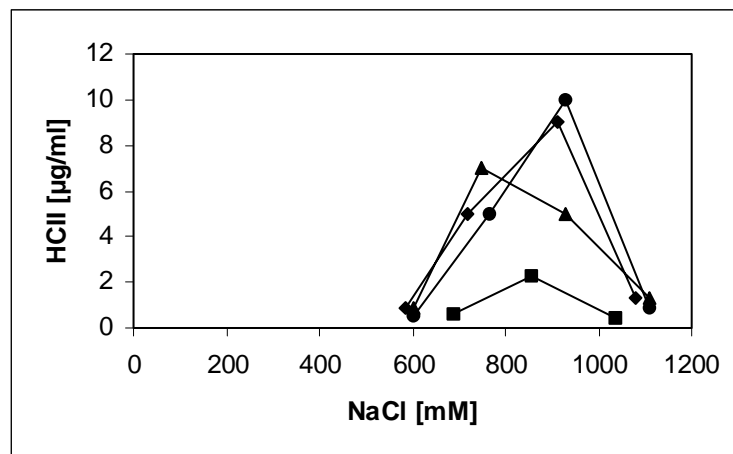


Abb. 57: Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie. Elution von HCII Δ 51-76 mit einem linearen NaCl-Gradienten in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA pH 7,4. Dargestellt sind die mit ELISA gemessenen HCII-Konzentrationen der Elutionsfraktionen von vier Läufen.

Damit liegt die Bindungsaffinität dieser HCII-Mutanten auf dem Niveau von AT α , das bei etwa 0,8 M NaCl eluiert (Abschn. III.4.1, Peterson & Blackburn 1985). AT bindet mit dieser hohen Affinität allerdings nur an eine bestimmte Pentasaccharid-Sequenz (s. Abb. 9c), die lediglich in einem Drittel der Moleküle in kommerziell erhältlichen Heparin-Präparationen enthalten ist (Oscarsson *et al.* 1989). Nieder-affines Heparin ohne diese Pentasaccharid-Sequenz eluiert von immobilisiertem AT bereits unterhalb von 0,2 M NaCl (Höök *et al.* 1976). Bei Heparin ist im Gegensatz zu Dermatansulfat keine Sequenzspezifität für HCII festgestellt worden (Petitou *et al.* 1988). Jedoch steigt mit einer höheren Ladungsdichte des Heparin-Polymers die Affinität zu HCII.

5.3 HCII aus Tunicamycin-behandelten CHO- und HepG2-Zellen

HCII ist ein Glykoprotein mit drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen in den Positionen 30, 169 und 368 (Ragg 1986), die sich in der Aminosäure-Sequenz mit Hilfe der Konsensus-Sequenz identifizieren (s. Abschn. I.5.1) lassen. Die Verwendung des N-Glykosylierungs-Inhibitors Tunicamycin (s. Abschn. III.9.1) erlaubte eine spezifische Unterdrückung der N-Glykosylierung während der Protein-Biosynthese.

5.3.1 Hemmung der N-Glykosylierung mit Tunicamycin

Um die Auswirkung der N-Glykosylierung auf die Heparin-Affinität zu untersuchen, wurde in CHO_{HCII}- und HepG2-Zellen exprimiertes HCII verwendet, dessen N-Glykosylierung mit Tunicamycin metabolisch gehemmt war. Diese Zellen sollten sulfatiertes HCII exprimieren, das jedoch keine N-Glykane trägt.

Die Wirkung von Tunicamycin auf die Glykosylierung von HCII ist dosisabhängig, wie Abbildung 58 zeigt. Bei der niedrigsten Tunicamycin-Konzentration von 0,1 µg/ml sind im Wes-

tern-Blot vier Banden zu erkennen (Abb. 58a Spur 2 u. 58b). Höhere Konzentrationen als 0,2 $\mu\text{g/ml}$ erzielen keine weitere Glykosylierungs-Hemmung. Auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration sind Spuren von voll glykosyliertem HCII im Überstand enthalten. Die unterste Bande in den Spuren 2-6 entspricht unglykosyliertem HCII, da es die gleiche Molekularmasse von 64 kD aufweist wie mit PNGase F N-deglykosyliertes HCII (Abb. 58 Spur 7). Auch HCII aus *E. coli* und chemisch mit Trifluormethansulfonsäure (TFMS) deglykosyliertes HCII zeigt in der SDS-PAGE eine Molekularmasse von 64 kD (Eckert 1999).

Die vier Banden in Spur 2 (Abb. 58a u. b) repräsentieren vermutlich die vier möglichen Glykosylierungs-Zustände von HCII mit null bis drei N-Glykanen. CHO-Zellen glykosylieren demnach alle drei Konsensus-Sequenzen. Pro N-Glykan erhöht sich die apparente Molekularmasse von HCII im SDS-Gel um 3-6 kD, ein Effekt, der auch bei rekombinantem CHO-AT zu beobachten ist (Ni *et al.* 2000).

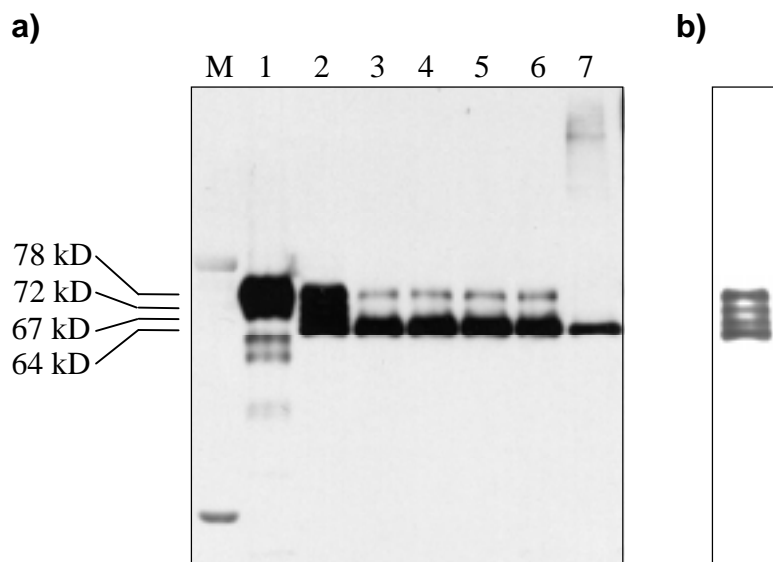


Abb. 58: Western-Blot zum Nachweis der Wirkung von Tunicamycin auf rekombinantes HCII aus CHO-Zellen. **a)** Überstände von Tunicamycin-behandelten CHO_{HCII}-Zellen.

M: LMW-Marker; Spur 1: 0 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin; Spur 2: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin; Spur 3: 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin; Spur 4: 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin; Spur 5: 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin; Spur 6: 10 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin; Spur 7: Plasma-HCII, PNGase-F-verdaut.

b) Spur 2 in anderer Darstellung (mit gesteigerter Helligkeit und größerem Kontrast), um die Einzelbanden sichtbar zu machen.

5.3.2 Heparin-Affinität von HCII aus Tunicamycin-behandelten Zellen

Die Herstellung von N-glykanfreiem HCII erfolgte in CHO_{HCII}- und HepG2-Zellen in Gegenwart von Tunicamycin. Das HCII wurde anschließend auf seine Heparin-Affinität untersucht. Jeweils etwa 50 ml durch Dialyse entsalzte Kulturüberstände wurden auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen und nach dem Waschen mit einem linearen NaCl-Gradienten

eluiert (s. Abschn. II.5.7). Die Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt und geblottet.

Die Fraktionierung des CHO-Überstandes ist in Abbildung 59 (Spuren 1-10) dargestellt. Bei 78 kD (Spur 5) ist in der Immundetektion eine HCII-Bande sichtbar, deren apparente Molekularmasse voll glykosyliertem HCII entspricht. In der Probe (Spur P) ist diese Bande wegen der geringen aufgetragenen Menge nicht zu sehen. Bereits in Vorversuchen (Abb. 58) wurde beobachtet, daß Tunicamycin-behandelte CHO-Zellen einen kleinen Anteil voll glykosyliertes HCII produzieren. Die HCII-Bande bei 64 kD entspricht auf Grund der Molekularmasse unglykosyliertem HCII. Vollständig glykosyliertes CHO-HCII (78 kD) eluiert bei 280 mM NaCl, während die Elution von unglykosyliertem HCII (64 kD) bei 330 mM NaCl erfolgt.

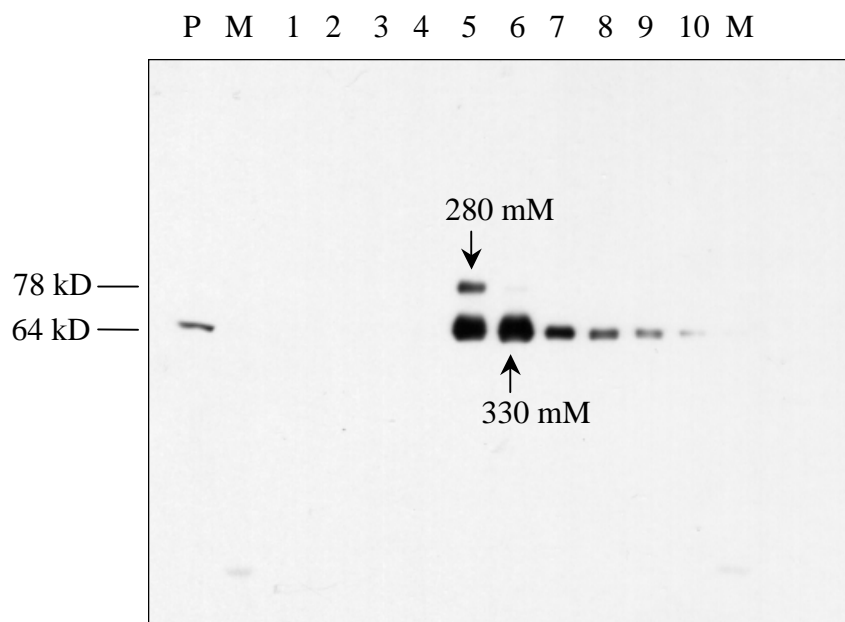


Abb. 59: Einfluß des N-Glykosylierungs-Inhibitors Tunicamycin auf die Heparin-Bindung von HCII aus CHO-Zellen. Der Überstand von Tunicamycin (1 µg/ml) behandelten CHO_{HCII}-Zellen wurde auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten. P: CHO_{HCII}-Überstand; M: Größenmarker (LMW); Spur 1-10: Elutionsfraktionen mit je 50 mM höherer NaCl-Konzentration.

HepG2-Zellen stellen eine zweite Quelle für humanes HCII dar und wurden ebenfalls verwendet, um mit Tunicamycin N-glykanfreies HCII herzustellen. Das Elutionsverhalten an Heparin-Sepharose zeigt Abbildung 60. Bei der Tunicamycin-Hemmung der N-Glykosylierung entstanden zusätzliche HCII-Banden, die unvollständig N-glykosyliertes HCII darstellen (s. Abschnitt III.4.3.1). Es sind wie auch beim HCII aus CHO_{HCII}-Zellen (Abb. 58) vier Banden zu sehen, die wahrscheinlich HCII mit null bis drei N-Glykanen repräsentieren. Die Bande bei 78 kD (Abb. 60) entspricht voll glykosyliertem HCII, das bei 230-280 mM NaCl eluiert, während die Elution von unglykosyliertem HCII (64 kD) bei 280-330 mM NaCl erfolgt. Die beiden Zwischenbanden bei 72 und 67 kD, die ein- und zweifach glykosyliertem HCII entsprechen, liegen in ihrer Heparin-Affinität zwischen dem nicht und dem voll glykosylierten HCII. Wie auch beim CHO-HCII war eine Verschiebung der Heparin-Elution um ca.

50 mM NaCl zu beobachten. Die vollständige Entfernung der N-Glykane führt demnach zu einer leichten, aber reproduzierbaren Erhöhung der Heparin-Affinität von HCII.

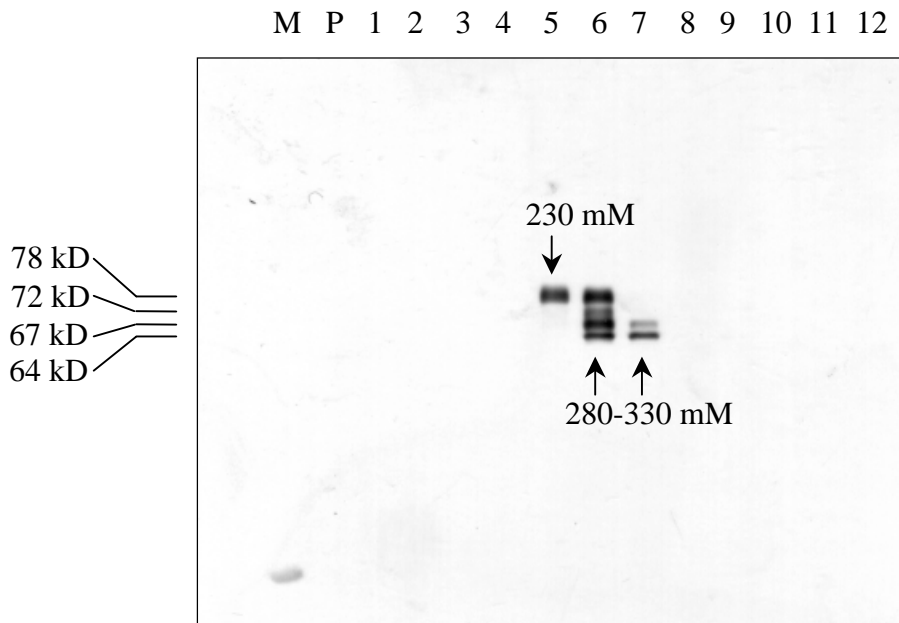


Abb. 60: Einfluß des N-Glykosylierungs-Inhibitors Tunicamycin auf die Heparin-Bindung von HCII aus HepG2-Zellen. Der Überstand von Tunicamycin (2 mg/ml) behandelten HepG2-Zellen wurde auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten. P: HepG2-Überstand (HCII-Banden nur bei längerer Belichtungszeit sichtbar); M: Größenmarker (LMW); Spur 1-12: Elutionsfraktionen mit je 50 mM höherer NaCl-Konzentration.

5.4 HCII aus Chlorat-behandelten CHO-Zellen

Durch den Zusatz von Chlorat zum Kulturmedium sollte die Sulfatierung der Tyrosin-Reste 60 und 73 inhibiert werden, die im Plasma-HCII Sulfatgruppen tragen (Hortin *et al.* 1986). HCII-haltige Überstände (50 ml) von Chlorat-behandelten CHO_{HCII}-Zellen (s. Abschn. II.1.9.2) wurden durch Dialyse entsalzt und auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Heparin-Affinität wurde dann mit einem linearen NaCl-Gradienten bestimmt (s. Abschn. II.5.7), wobei zur Auswertung wieder der Western-Blot verwendet wurde.

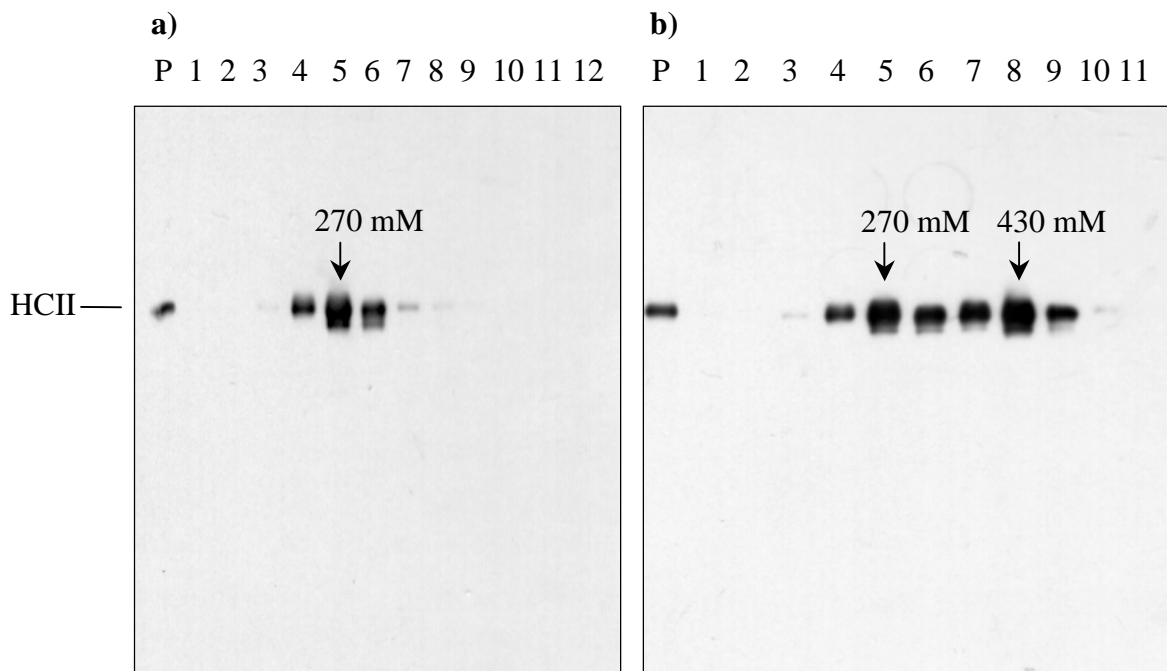


Abb. 61: Einfluß des Sulfatierungs-Inhibitors Chlorat auf die Heparin-Bindung von HCII aus CHO-Zellen. Fraktionierung des Überstandes von CHO_{HCII}-Zellen, die in sulfatfreiem Medium ohne Chlorat (a) und mit 20 mM Chlorat (b) inkubiert wurden. Die Elution von der Heparin-Sepharose erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten.

a) P: Überstand von CHO_{HCII}-Zellen ohne Chlorat; Spur 1-12: Elutionsfraktionen mit je 50 mM höherer NaCl-Konzentration.

b) P: Überstand von CHO_{HCII}-Zellen mit 20 mM Chlorat; Spur 1-11: Elutionsfraktionen mit je 50 mM höherer NaCl-Konzentration.

Das Elutionsprofil von Chlorat-behandeltem HCII (Abb. 61b) ließ zwei Maxima mit gleicher apparenter Molekularmasse erkennen. Das erste Maximum lag bei 270 mM NaCl und hatte damit den gleichen Wert wie nicht Chlorat-behandeltes CHO-HCII im Kontrollversuch (Abb. 61a). Das zweite Maximum lag bei 430 mM NaCl. Da das zweite Maximum im Kontrollversuch nicht auftritt, müßte bei 430 mM NaCl eluierendes HCII eine durch Chlorat inhibierte unsulfatierte HCII-Variante darstellen.

Einen weiteren Versuch gibt Abbildung 62 wieder, dessen Elutionsfraktionen mit dem Western-Blot (o. Abb.) und mit dem ELISA ausgewertet wurden. Dort traten zwei Maxima bei 250 bzw. 410 mM NaCl auf. Das zweite Maximum ist geringer ausgeprägt als bei dem Versuch in Abbildung 61b. Dies ist vermutlich auf Unterschiede in der Chlorat-Konzentration und anderes Medium zurückzuführen. Offensichtlich führt eine höhere Chlorat-Konzentration in Verbindung mit Chlorat-freiem Medium (Abb. 61b) zu einer effizienteren Sulfatierungs-Inhibition.

Die Ursache für die erhöhte Affinität des unsulfatierten HCII kann mit der Struktur von HCII erklärt werden: Die sulfatierten Tyrosine befinden sich in der sauren N-terminalen Domäne,

die in Abwesenheit von GAGs intramolekular an die basische GAG-Bindungsstelle von HCII bindet (Ragg *et al.* 1990a, Van Deerlin & Tollefsen 1991). Die zwei fehlenden negativen Ladungen der Sulfatreste müßten demzufolge die Wechselwirkung mit der positiv geladenen GAG-Bindungsstelle schwächen und dadurch die GAG-Bindungsaffinität erhöhen (vergl. Abb. 2 u. 5 in Abschn. I.3.3).

Im Gegensatz zu fehlenden N-Glykanen von HCII, die sich je N-Glykan an einer um 3-6 kD reduzierten apparenten Molekularmasse erkennen ließen, ist von den vergleichsweise kleinen Sulfatgruppen keine erkennbare veränderte elektrophoretische Mobilität des SDS-komplexierten Proteins zu erwarten. Der Western-Blot konnte daher keinen Hinweis auf die Sulfatierung von HCII geben. Das unsulfatierte HCII müßte jedoch einen höheren isoelektrischen Punkt besitzen, da dessen Netto-Ladung um zwei negative Ladungen reduziert ist. Die entsprechenden Fraktionen wurden daher mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese untersucht.

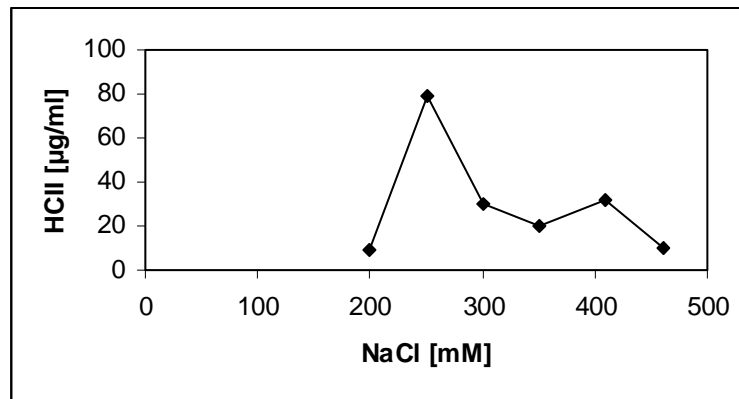


Abb. 62: Einfluß von Chlorat auf das Heparin-Bindungsverhalten von HCII. Fraktionierung auf Heparin-Sepharose des Überstandes von CHO_{HCII}-Zellen, die in sulfathaltigem DMEM/F12-Medium mit 10 mM Chlorat inkubiert wurden. Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-1 M NaCl). HCII-Konzentrationsbestimmung der Elutionsfraktionen mittels ELISA.

5.4.1 2D-Gelelektrophorese von HCII aus Chlorat-behandelten Zellen

Vorversuche zeigten, daß eine Untersuchung von HCII der Proben der Fraktionen mit 270 und 430 mM NaCl (s. Abb. 61 b) allein mit isoelektrischer Fokussierung nicht ausreichte, da die Auswertung durch verunreinigende Proteine erschwert wurde. Die Proben enthielten vermutlich Reste von BSA, welches dem Chlorat-haltigen serumfreien Medium in einer Konzentration von 0,5 g/l als Proteolyse-Schutzprotein zugegeben war. Um HCII von solchen Protein-Verunreinigungen anhand der Molekularmasse unterscheiden zu können, wurden die Proben mit Hilfe der 2D-Elektrophorese aufgetrennt.

Für jede Probe wurden parallel zwei Gele angefertigt. Ein Gel diente der Silberfärbung, während das andere geblottet wurde, um mittels Immundetektion die Position der HCII-Spots eindeutig bestimmen zu können.

HCII befand sich auf Höhe des 76 kD Markers und zeigte eine Kette von Spots, die bei der Silberfärbung (Abb. 64a,b) und im Western-Blot (Abb. 64c,d) gut zu erkennen waren.

In der Immundetektion waren weitere HCII-positive Banden pH <4,5 und um pH 6,3 sichtbar. Diese stellten wohl Artefakte dar, da sie sich im Bereich der Elektroden befanden. Proteine, die sich während der IEF-Trennung außerhalb des elektrischen Feldes in der Nähe der Elektroden befinden, gelangen durch Diffusion an der Elektrode vorbei in das elektrische Feld und bilden dort in Laufrichtung Streifen.

Die vier Markerproteine ließen eine pI-Bestimmung in den silbergefärbten Gelen zu. Je acht erkennbare HCII-Spots in der 270 mM NaCl-Fraktion (Abb. 64a) lagen zwischen pH 5,2 und 5,6. In der Probe der Fraktion mit 430 mM NaCl (Abb. 64 b) ließen sich acht HCII-Spots zwischen pH 5,3 und 5,8 erkennen. Das HCII mit der höheren Heparin-Affinität hatte demnach ein etwas zum Basischen verschobenes Spot-Muster. Diese Verschiebung läßt sich besonders gut erkennen, wenn man die Positionen der HCII-Spots mit den Albumin-Spots (Marker Nr. 3) in Abbildung 64 a und b vergleicht.

Hochgereinigtes Plasma-HCII, wie es auch für die Glykoanalytik verwendet wurde, ließ im 2D-Gel bis zu zehn Spots erkennen (Abb. 65).

Mit Hilfe der IEF bzw. 2D-Gelelektrophorese lassen sich prinzipiell Unterschiede in der Protein-Nettoladung bis zu einer Ladungseinheit auflösen. Die Anzahl der erzeugten Spots gibt demnach die Anzahl der Netto-Ladungszustände wieder. Der theoretische pI des HCII-Polypeptids beträgt 6,26 (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), wobei nur Sialidase-verdautes HCII (Kim *et al.* 1988) oder TFMS-deglykosyliertes HCII (Eckert 1999) diesem Wert in etwa entspricht.

Die stärker sauren pI-Werte aller HCII-Spots stellen negativer geladene HCII-Varianten dar. Deren zusätzliche negativen Ladungen können grundsätzlich entweder auf posttranslationalen Modifikationen beruhen oder Isoformen mit abweichender AS-Sequenz darstellen. Da beim HCII negativ geladene N-Glykane und Sulfatierungen nachgewiesen wurden, lassen sich die zahlreichen HCII-Varianten mit unterschiedlichen pI durch Sialylierungs-Heterogenität der N-Glykane und unvollständige Sulfatierung der Tyrosin-Reste 60 und 73 erklären. Ein hypothetisches HCII mit drei biantennären N-Glykanen, die bis zu 6fach sialyliert sind, und mit zwei Sulfatierungsstellen, ergäbe neun Ladungsvarianten, die in der IEF als distinkte Spots darstellbar sind.

Treten mehr Spots auf, könnten evtl. N-Glykane mit höherer Antennarität vorhanden sein. Weniger als 9 Spots weisen auf einheitlichere Sialylierung und/oder Sulfatierung hin. Unter Chlorat-Einfluß war ein Spotmuster aus je acht Spots zu erkennen, das jedoch zum Basischen verschoben waren. Daher müßte das bei 270 mM NaCl eluierende CHO-HCII vollständig sulfatiert sein, während das 430 mM NaCl eluierende CHO-HCII nicht sulfatiert ist, wobei der Sialylierungsstatus unverändert blieb.

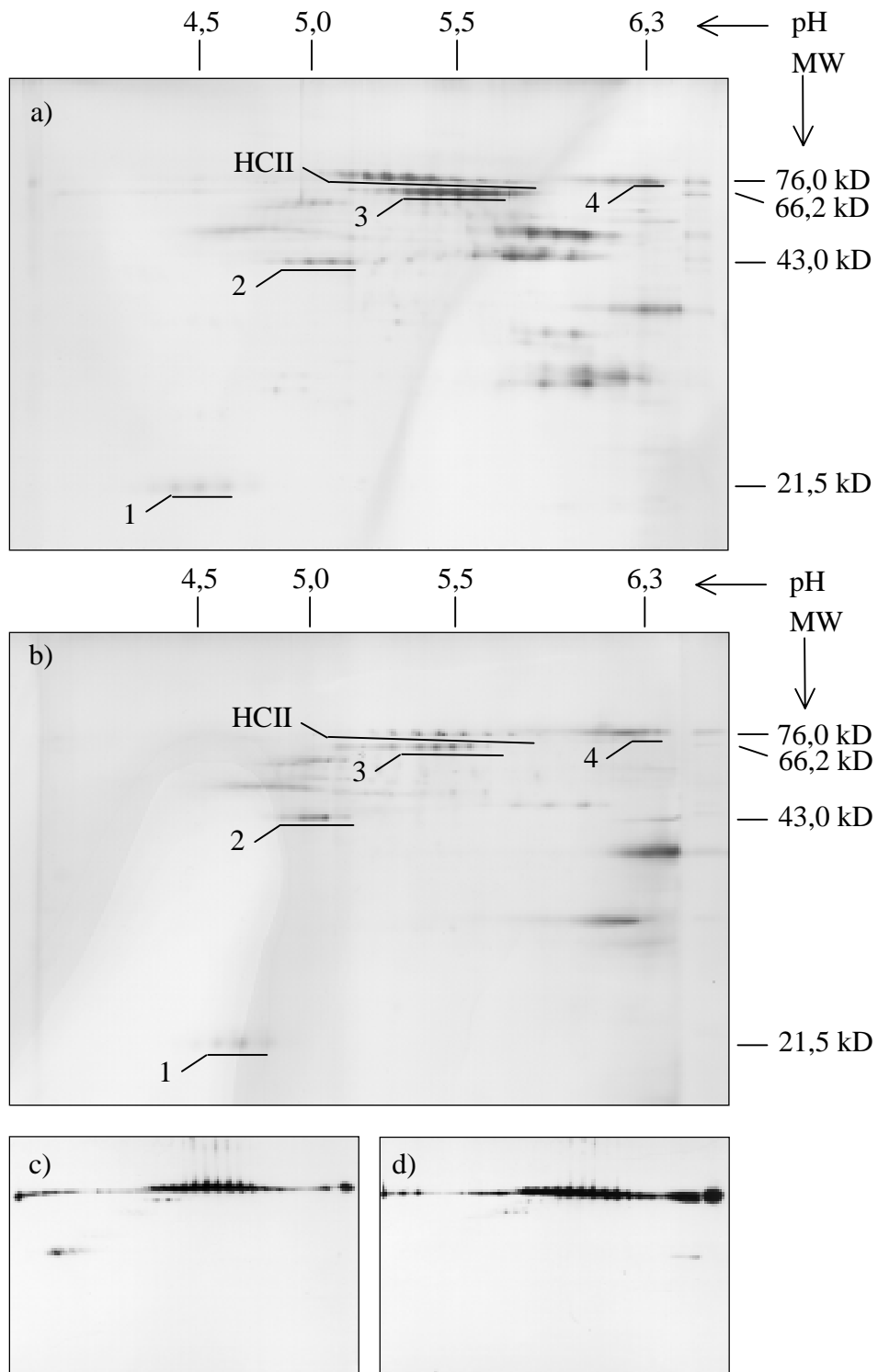


Abb. 64: 2D-Elektrophorese von HCII, das unter dem Einfluß des Sulfatierungs-Inhibitors Chlorat in CHO-Zellen produziert und auf Heparin-Sepharose (vergl. Abb. 62b) fraktioniert wurde. Proben der Fraktion mit 270 mM NaCl (a, c) bzw. 430 mM NaCl (b, d) wurden parallel in jeweils zwei Gelen getrennt. Je ein Gel diente der Silberfärbung (a, b) bzw. dem Western-Blot (c, d). Die Positionen der IEF-Marker-Proteine sind in der Silberfärbung (a, b) erkennbar:

1. Trypsininhibitor (Sojabohne) 21,5 kD; pH 4,5
2. Actin (Rindermuskel) 43,0 kD; pH 5,0 5,1
3. Albumin (Rinderserum) 66,2 kD; pH 5,4 5,5 5,6
4. Conalbumin (Hühnereiweiß) 76,0 kD; pH 6,0 6,3 6,6



Abb. 65: 2D-Elektrophorese (Silberfärbung) von Plasma-HCII, das mit abschließender Gelfiltration hoch aufgereinigt wurde (vgl. Abb. 27).

IV Diskussion

1 Herstellung und Reinigung von HCII

1.1 HCII-Reinigung aus humanem Plasma

Aus humanem Plasma konnte biologisch aktives HCII mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften isoliert werden. Die HCII-Reinigung aus Plasma wurde fast unverändert von Zhang *et al.* (1994) übernommen. Allerdings befand sich das HCII nach der auf die BaCl₂-Fällung folgenden PEG-Fällung nicht wie bei Zhang *et al.* beschrieben im Überstand, sondern im Pellet. Nach der älteren Vorschrift von Griffith *et al.* (1985) wird dieser Reinigungsschritt anders durchgeführt, denn dort wird dieses Pellet zunächst in 100 g/l PEG-haltigem Puffer resuspendiert. HCII befindet sich dann erst nach dem darauf folgenden Zentrifugationsschritt im Überstand. Entweder ist die Beschreibung von Zhang *et al.* lückenhaft oder Maus-HCII unterscheidet sich in seinem Fällungsverhalten deutlich von humanem HCII, wie es von Griffith *et al.* (1985) sowie in dieser Arbeit aufgereinigt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde die angegebene PEG-Menge zu dem jeweils vorgelegten Volumen zugegeben, so daß sich z.B. durch die Zugabe von 100 g PEG pro Liter vorgelegtes Volumen ein Endvolumen von ca. 1,1 l und damit eine etwas niedrigere Endkonzentration ergab. Eine unterschiedliche Interpretation der Konzentrationsangaben kann den oben beschriebenen Effekt jedoch nicht erklären.

Durch die Reinigung mit abschließender Mono-Q-Anionenaustauscherchromatographie konnte HCII gewonnen werden, dessen Reinheit für die Heparin-Bindungsversuche ausreichend war. Die von Griffith *et al.* (1985) beschriebene HCII-Reinigung stellte mit einer Ausbeute von 40 %, die in etwa auch in der vorliegenden Arbeit erzielt wurde, eine wesentliche Verbesserung gegenüber der Erstisolierung von HCII durch Tollefsen *et al.* (1982) dar. Dort betrug die Ausbeute nach Anionenaustauscher- und Affinitätschromatographie 9 %. Für die Glykosylierungsanalytik wurde HCII zusätzlich mittels Gelfiltration weiter aufgereinigt. Die Produktreinheit für die Glykosylierungsanalytik war erst nach der zusätzlichen Gelfiltration ausreichend (s. Abb 27). Auch Griffith *et al.* (1985) verwendeten eine Gelfiltration als letzten Reinigungsschritt, allerdings mit dem weniger gut auflösenden Gelmaterial Sephacryl S-300 (Pharmacia).

Nach dem Mono-Q-Reinigungsschritt zeigten die HCII-Proben neben Proteinverunreinigungen, die mit Coomassie-Blau anfärbbar waren, noch zahlreiche mit dieser Färbung nicht nachweisbare Verunreinigungen. Diese waren nach dem Elektro-Blot des SDS-Gels mit einem unspezifischen Kohlenhydratnachweis (ECL-Glycoprotein-Detection-Kit, Amersham) (Krüger 1998) oder mit bestimmten Lektinen (Jacalin, Con A, DSA, SNA) (Eckert 1999) auf der Blot-Membran nachweisbar. Diese Verunreinigungen liefen in der SDS-PAGE hauptsächlich zwischen dem 43 kD-Markerprotein bis weit oberhalb des 94 kD-Markers. Die Position im Gel läßt allerdings keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Molekularmasse zu, da Koh-

lenhydrate nicht im gleichen Verhältnis mit SDS beladen werden wie Proteine. Dieser Befund gab jedoch weiteren Anlaß zum Einsatz der Gelfiltration als letzten Reinigungsschritt von HCII für die Glykoanalytik.

Kürzlich konnte in der AG Zelluläre Genetik eine verstärkende Wirkung von Zink-Ionen auf die Heparinbindung von HCII nachgewiesen werden (Eckert 2000, pers. Mitteilung). Daher ist es wichtig darauf hinzuweisen, daß das in dieser Arbeit gereinigte HCII kein Zink enthielt. Plasma-HCII wurde aus Citrat-Plasma gewonnen und mit EDTA-haltigen Puffern gereinigt. Auch bei der Reinigung von CHO-Überständen wurde EDTA verwendet, um Metallo-Proteasen zu inaktivieren. Die eingesetzte EDTA-Konzentration war jedoch auch ausreichend, um alle im Plasma bzw. Medium enthaltenen zweiwertigen Kationen einschließlich Zn^{2+} zu komplexieren.

1.2 Herstellung von rekombinantem HCII in CHO-Zellen

Das Ziel, eine hoch HCII-exprimierende CHO-Zelllinie zu erzeugen, wurde erreicht. Während der MTX-Amplifikation verlief die Steigerung der Expression nicht parallel zur MTX-Konzentration wie z.B. bei der Amplifikation der Antithrombin-Expression in CHO-Zellen (Zettlmeissel *et al.* 1987), sondern sprunghaft von der 0,25 mM zur 2,5 mM MTX-Stufe.

Die Superspinner-Kultivierung erzeugte innerhalb von 4 Wochen vom Auftauen der Produktions-Zelllinie bis zum Abernten des Kulturüberstandes 10,5 mg rekombinantes HCII in einem Volumen von 1 l. Zum Zweck der Glykosylierungsanalytik wurde das HCII mit relativ hohen Verlusten (15 % Ausbeute) hoch aufgereinigt. Das gereinigte Material zeigte im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel keine Verunreinigungen mehr.

1.3 Herstellung von HCII in HepG2-Zellen

Im Überstand der HepG2-Zellen wurde nach der Aufreinigung (Heparin-Sepharose, Mono-Q) unterhalb der HCII-Hauptbande bei 76 kD eine HCII-Variante bei 66 kD beobachtet, die offensichtlich ebenfalls Thrombin komplexieren kann. Die HepG2-Kultur zeigte nach dreitägiger Kultivierung auffallend viele tote Zellen. Dieses HCII bei 66 kD könnte ein Produkt der Kultivierungsbedingungen sein und entsteht vermutlich, wenn während der Kultivierung ein Glucosemangel auftritt (Hellweg 2000). Möglicherweise handelt es sich daher bei der 66-kD-Bande um unvollständig glykosyliertes HCII.

1.4 Rekombinantes HCII Δ 51-76 aus *E. coli*

E. coli speichern hoch exprimierte rekombinante Proteine oft in unlöslicher Form als inclusion bodies. Diese enthalten Proteine in aggregierter Form und müssen daher zunächst in Lösung gebracht werden, um anschließend durch Renaturierung aktives Protein zu gewinnen. Vorversuche zeigten, daß sich die inclusion bodies nach der Bakterien-Lyse durch Zentrifugation (10.000 x g) leicht abtrennen lassen. Renaturierungsversuche von HCII Δ 51-76 mit der Verdünnungsmethode (Rudolph & Lilie 1996) schlugen fehl. Auch eine von Blackwell &

Horgan (1991) beschriebene Methode zur Erhöhung des Anteils biologisch aktiver (korrekt gefalteter) Proteine durch osmotischen Streß und Aufnahme von Glycyl-Betain in die Zellen zeigte bei HCII Δ 51-76 keinen entsprechenden Effekt.

Die Expression von HCII Δ 51-76 zeigte, daß die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein mit 3,3 % (ELISA-Messung) gering war (Tab. 13). Als korrekt gefaltetes Protein wurde in diesem Zusammenhang das von Heparin-Sepharose im Stufengradienten (0,5 und 1,0 M NaCl) bei 1,0 M NaCl eluierende HCII Δ 51-76 gewertet.

Auch Wildtyp-HCII, das in *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pFKR3 im 5-l-Reaktor exprimiert wurde, band nur zu 1,3 % an Heparin (Krepulat 1999). Die Gründe für die niedrige Ausbeute können vielfältig sein. So könnten die Faltungsintermediate eine starke Tendenz zur Aggregation haben und lägen damit denaturiert vor. Viele Serpine sind thermodynamisch metastabil, solange sie nicht an der reaktiven Schleife gespalten sind (Bruch *et al.* 1988, Gettins *et al.* 1996). Dies unterstützt die Hypothese, daß sich HCII in *E. coli* nur unvollständig zur nativen Tertiärstruktur faltet. Das dem HCII verwandte Antithrombin (AT) läßt sich nach Denaturierung mit Guanidinium-Chlorid nicht zum nativen Zustand rückfalten, da partiell renaturierte Intermediate aggregieren (Fish *et al.* 1985). Dies könnte auch eine Erklärung für die schlechte Renaturierbarkeit von HCII aus inclusion bodies liefern. Glykosylierungen, die von Prokaryoten nicht erzeugt werden können, unterstützen möglicherweise die Faltung zur nativen Form. Allerdings waren die eukaryotischen Expressionssysteme CHO und HepG2 durchaus in der Lage, aktives unglykosyliertes HCII zu exprimieren, wenn die Glykosylierung mit Tunicamycin unterdrückt wurde (s. Abschn. III.5.3.2). Dies könnte auf die Bedeutung des endoplasmatischen Reticulums mit seinen eukaryotischen Chaperonen und Disulfidisomerasen hinweisen (High *et al.* 2000), das *E. coli* nicht zur Verfügung steht.

HCII wurde schon in verschiedenen *E.-coli*-Stämmen exprimiert. Pro Liter Bakterienkultur konnten aus *E. coli* 522 NM 19 nmol lösliches HCII (Blinder *et al.* 1988) und aus *E. coli* JM101 (Blinder & Tollefsen 1990) 393 nmol gewonnen werden. Von letzterem band 30 % nicht an Heparin. Derechin & Blinder (1990) isolierten 7,9 nmol Heparin-bindendes HCII pro Liter Kultur. Dies entsprach den 7,7 nmol HCII Δ 51-76 pro Liter, die in dieser Arbeit aus der 5-l-Fermentation isoliert werden konnte.

Auch *E. coli* BL21(DE3) wurde bereits zur HCII-Expression verwendet (Han *et al.* 1997, Han & Tollefsen 1998, Colwell *et al.* 1999), wobei das verwendete großvolumige Kultivierungssystem (BioFlo III Fermenter, New Brunswick) und die große zur Aufarbeitung genutzte 1,4-Liter-Heparin-Sepharose-Säule ebenfalls auf eher geringe Ausbeuten schließen läßt, wobei dort dazu allerdings keine Angaben gemacht wurden.

2 Posttranslationale Modifikationen von HCII aus Plasma und CHO-Zellen

Die Struktur der N-Glykane des gereinigten HCII aus humanem Plasma und rekombinant aus CHO-Zellen konnte von der Arbeitsgruppe von Dr. H. S. Conradt an der GBF aufgeklärt werden. Auch der Umfang der Tyrosin-Sulfatierung von HCII wurde analysiert.

2.1 Struktur der N-Glykane

HCII trägt überwiegend die bei Plasma-Proteinen verbreiteten sialylierten biantennären nicht proximal fucosylierten N-Glykane (Grabenhorst *et al.* 1999), wobei etwa 8 % der N-Glykane triantennär sind (Böhme *et al.* 2001). Ein überraschender Befund ist jedoch, daß die triantennären N-Glykane überwiegend (Sialyl)-Lewis^X-Determinanten tragen, die durch eine periphere $\alpha(1\rightarrow3)$ -Fucosylierung des peripheren N-Acetylglucosamin-Restes erzeugt wird (Grabenhorst *et al.* 1998). Bei anderen Plasmaproteinen (α_1 -saures Glykoprotein, α_1 -Antichymotrypsin und Haptoglobin) konnte gezeigt werden, daß die Synthese des Sialyl-Lewis^X-Motivs durch akute oder chronische Entzündungen induziert wird (Brinkman-van der Linden *et al.* 1998). Die genannten Proteine sind Akute-Phase-Proteine, die durch Cytokine vermittelt bei Entzündungsreaktion vermehrt in der Leber synthetisiert werden (Gabay & Kushner 1999). Da auch die Konzentration von HCII bei der Akute-Phase-Reaktion erhöht ist (Sandset & Andersson 1989, Toulon *et al.* 1991), wird eine Beteiligung von HCII bei entzündlichen Prozessen diskutiert. H. S. Conradt und Mitarbeiter konnten auch auf weiteren Plasma-Proteinen (α_1 -Mikroglobulin, Hemopexin, α_1 -Antitrypsin) Sialyl-Lewis^X-Motive nachweisen (Böhme *et al.* 2001). Sialyl-Lewis^X-Motive binden an Selectine, die auf der Oberfläche von Endothelzellen und Thrombozyten vorkommen und deren Expression und Präsentation einer exakten Regulation unterliegen. Die Selectine spielen eine Schlüsselrolle bei der Interaktion (rolling) zwischen Leukozyten und Endothelzellen im entzündeten Gewebe (Lasky 1992, Whelan 1996), die durch Plasmaproteine mit Sialyl-Lewis^X-Motiven beeinflusst werden könnte. HCII mit Sialyl-Lewis^X-Determinante könnte sich durch die Bindung an E- und P-Selectin auf den entsprechenden Zellen anreichern, um an diesen Orten eine verstärkte Rolle bei der Regulation von Thrombin zu spielen, das an zahlreichen Prozessen der Blutgerinnung und Gewebereparatur beteiligt ist (s. Abschn. I.3.5, Abb. 7 u. 8).

Bestimmte Unterschiede in der N-Glykan-Struktur zwischen HCII aus humanem Plasma und dem rekombinanten Protein sind typisch für CHO-Zellen. Dieser Zelllinie fehlt das Enzym $\alpha(1\rightarrow3/4)$ -Fucosyltransferase, das Voraussetzung für die Sialyl-Lewis^X-Synthese ist.

Da CHO-Zellen keine $\alpha(2\rightarrow6)$ -Sialyltransferase besitzen, können sie lediglich $\alpha(2\rightarrow3)$ -Sialylierungen erzeugen (Grabenhorst *et al.* 1998 u. 1999). Die proximale Fucosylierung, die von CHO-Zellen vorgenommen wird, kann auch von humanen Zellen durchgeführt werden. Wie das Beispiel Transferrin zeigt, werden proximal fucosylierte N-Glykane im Gehirn synthetisiert, nicht jedoch in der Leber, so daß sich im Plasma lediglich proximal unfucosyliertes Transferrin befindet (Hoffmann *et al.* 1995).

2.2 Analyse der Tyrosin-Sulfatierungen

Bei Hortin *et al.* (1986) wurde die Sulfatierung der beiden Tyrosin-Reste 60 und 73 von HCII aus HepG2-Zellen beschrieben. Diese Sulfatierungen konnten nun auch in HCII aus humanem Plasma und CHO-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus ließ sich der Umfang der Sul-

fatierung erstmals quantifizieren. Es zeigte sich, daß HCII aus CHO-Zellen am Tyrosin 73 überwiegend (70 –80%) sulfatiert ist, während Tyrosin 60 ebenso wie beide Tyrosin-Reste von Plasma-HCII eine fast vollständige (90 %) Sulfatierung aufweisen.

Andere rekombinante Proteine (Faktor VIII, Faktor IX) wurden in CHO-Zellen nur unvollständig sulfatiert (Mikkelsen *et al.* 1991, White *et al.* 1997). Bei einer weiteren Hamster-Zelllinie (HIT-Zellen) wurde nachgewiesen, daß der Umfang der Sulfatierung eines Tyrosin-Restes von Gastrin stark von dem Konsensus-Signal abhängig ist (Bundgaard *et al.* 1997). HCII besitzt jedoch in seiner Konsensus-Sequenz keine der bei Bundgaard *et al.* (1997) genannten basischen Aminosäure-Reste in Position –1, die zu einer herabgesetzten Sulfatierungs-Effizienz führen.

Die massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) der tryptischen Peptide zeigte, daß Methionin-Reste (z. B. 336 und 442) teilweise oxidiert sind (Böhme *et al.* 2001).

Bei einem anderen Serpin (α_1 -Antitrypsin) bewirkt die Oxidation von bestimmten Methionin-Resten (351 und 358) den Verlust der inhibitorischen Aktivität gegenüber der Ziel-Protease (Elastase). Diese Oxidation kann z. B. durch oxidierende Agentien verursacht werden, wie sie von aktivierten neutrophilen Granulozyten während einer Endzündungsreaktion freigesetzt werden (Taggart *et al.* 2000).

Die Methionin-Reste 351 und 358 befinden sich bei α_1 -Antitrypsin in der reaktiven Schleife (Position P8 bzw. P1). Da bei HCII der Methionin-Rest 442 ebenfalls in der reaktiven Schleife (Position P3) liegt, könnte dessen Oxidation die Thrombin-Inhibition beeinflussen.

Bei AT hat die Oxidation von Methionin-Resten, die sich alle außerhalb der reaktiven Schleife befinden, nur einen äußerst geringfügigen Einfluß auf dessen Aktivität (Van Patten *et al.* 1999).

3 In situ-Nachweis von HCII

Heparin-Sepharose-Partikel dienen als Modell für den in situ-Nachweis von HCII in der extrazellulären Matrix (ECM). Bei physiologischer Ionenstärke konnte eine Bindung von Plasma-HCII an Heparin mit Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich löst sich HCII bei der physiologischen Ionenstärke des PBS-Puffers während der zahlreichen Inkubationsschritte der Immunfluoreszenz-Färbung von Heparin ab. Eine verringerte Ionenstärke sollte die HCII-Affinität erhöhen, jedoch zeigten dann die verwendeten Antikörper eine deutliche unspezifische Bindung. Hier zeigte sich die große Bedeutung der Ionenstärke des Puffersystems für die Spezifität der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung bei immunologischen Methoden.

Mit kovalent FITC-markiertem HCII ließ sich die NaCl-Abhängigkeit der Heparinbindung auch fluoreszenzmikroskopisch zeigen. Bereits eine Inkubation von 5 x 5 min mit 50 mM NaCl in Phosphatpuffer führte zu einer deutlichen Ablösung des HCII von Heparin.

Es besteht ein scheinbarer Widerspruch in der Beobachtung, daß eine effektive Aktivierung der Thrombin-Inhibitorfunktion von HCII durch Heparin bei einer physiologischen NaCl-

Konzentration möglich ist, aber eine feste Bindung von HCII, wie sie der Immunfluoreszenznachweis erfordert, bei dieser Ionenstärke nicht gegeben ist. Die Heparin-abhängige HCII-Thrombininhibition ist stark von der NaCl-Ionenstärke abhängig, wobei die maximale Geschwindigkeit der Thrombinhemmung zwischen 50 und 100 mM NaCl liegt und darüber bzw. darunter deutlich sinkt. Bei 150 mM NaCl beträgt sie nur noch etwa die Hälfte der maximalen Geschwindigkeit (Church *et al.* 1989). Demnach ist für die Thrombinhemmung eine festere Heparinbindung, wie sie bei 50–100 mM NaCl gegeben ist, förderlich, wobei die geringere Affinität bei physiologischer Ionenstärke immer noch eine effektive HCII-Aktivierung ermöglicht. Die Aktivierung der Thrombin-Inhibition benötigt demnach offenbar keine dauerhafte und feste Bindung an GAG-Bestandteile der ECM, wie sie für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis Voraussetzung ist.

Allerdings ist anzumerken, daß *in vivo* wegen der komplexeren Ionenzusammensetzung des Plasmas andere Verhältnisse herrschen könnten. Zn^{2+} -Ionen können in einer Konzentration wie sie im Plasma herrscht (um 10 μ M) eine Steigerung der Heparin-Affinität von HCII bewirken (Eckert 2000, pers. Mitteilung).

Die Affinität von FITC-konjugiertem HCII zu Heparin könnte von unmarkiertem HCII abweichen, da die FITC-Kopplung an das Protein über Aminogruppen erfolgt. Davon sind möglicherweise auch die an der Heparin-Bindung beteiligten Arginin- und Lysinreste betroffen. Da die Heparinbindungsstelle nach dem derzeit gültigen Modell (Ragg *et al.* 1990a) jedoch intramolekular vom sauren N-Terminus abgedeckt wird, ist es theoretisch möglich, daß dieser Bereich während der Kopplungsreaktion schlecht zugänglich und damit geschützt vorlag.

Die Präparation der ECM hinterließ DNA-Reste, wenn die Zellen mit 0,5 % Triton X-100/20 mM NH_4OH lysiert wurden. Darauf gab es in der Literatur keine Hinweise. Da sich HCII durch Polynukleotide aktivieren läßt (Church *et al.* 1988), sollte DNA aus ECM-Präparaten möglichst entfernt werden.

Alternative, weniger denaturierende ECM Präparationsmethoden mit EDTA (Hindmarsh & Marks 1998) oder Cytochalasin (Mai & Chung 1984) sollten in Zukunft getestet werden.

Bisher wurde die aus der ECM-Bindung resultierende HCII-Aktivierung und die damit verbundene Thrombin-Komplexbildung untersucht und beschrieben (McGuire & Tollefsen 1987; Hiramoto & Cunningham 1988; Whinna *et al.* 1993; Shirk *et al.* 1996 u. 2000). Einen direkten Bindungsnachweis von HCII *in situ* gab es bisher nicht.

Die Etablierung des Immunfluoreszenz-Nachweises von HCII mit Hilfe der Deletionsmutante HCII Δ 51-76 schafft die Basis für weitergehende Studien, z. B. um bisher unbekanntes Bindungspartner oder Rezeptoren von Plasma-HCII aufzufinden. Der *in situ* HCII-Nachweis z.B. in Gewebeschnitt-Präparaten könnte Aufschluß über die Verteilung von HCII im Gewebe und damit Einblicke in die Beteiligung von HCII bei pathologischen Vorgängen geben. HCII könnte in seiner Funktion als selektiver Inhibitor von Thrombin bei medizinischen Fragestellungen, an denen Thrombin beteiligt ist, eine Rolle spielen. Thrombin beeinflusst unmittelbar Krankheiten wie Thrombose, Entzündungen, Alzheimer und Krebs (vgl. Abschn. I.3.5).

4 Affinität von HCII, AT und deren Thrombin-Komplexe zu Heparin¹

Als Maß für die Affinität der Proteine zu Heparin wird in der vorliegenden Arbeit die NaCl-Konzentration verwendet, die eine Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten von einer Säule mit immobilisiertem Heparin bewirkt (s. Abschnitt I.4.4.1). Je höher die zur Elution benötigte NaCl-Konzentration ist, desto höher ist die Affinität bei einer bestimmten (z.B. physiologischen) Ionenstärke bzw. desto niedriger ist die entsprechende Dissoziationskonstante (vgl. Gleichung 3 in Abschnitt I.4.4.1).

Vergleicht man die Affinitäten der beiden Serpine (HCII, AT) und deren Thrombin-Komplexe (THCII, TAT) zu Heparin und Dermatansulfat (Abb. 66), kann folgendes festgestellt werden¹:

1. Die Heparin-Affinität von TAT und Thrombin ist identisch.
2. Die Heparin-Affinität von AT sinkt durch die Komplexbildung mit Thrombin.
3. Die Heparin-Bindungsstelle des TAT-Komplexes ist unbekannt.
4. Die Heparin-Affinität von Thrombin sinkt durch die Komplexbildung mit HCII.
5. Die Heparin-Affinität von HCII nach der Komplexbildung ist unbekannt.
6. Die Heparin-Bindungsstelle des THCII-Komplexes ist unbekannt.

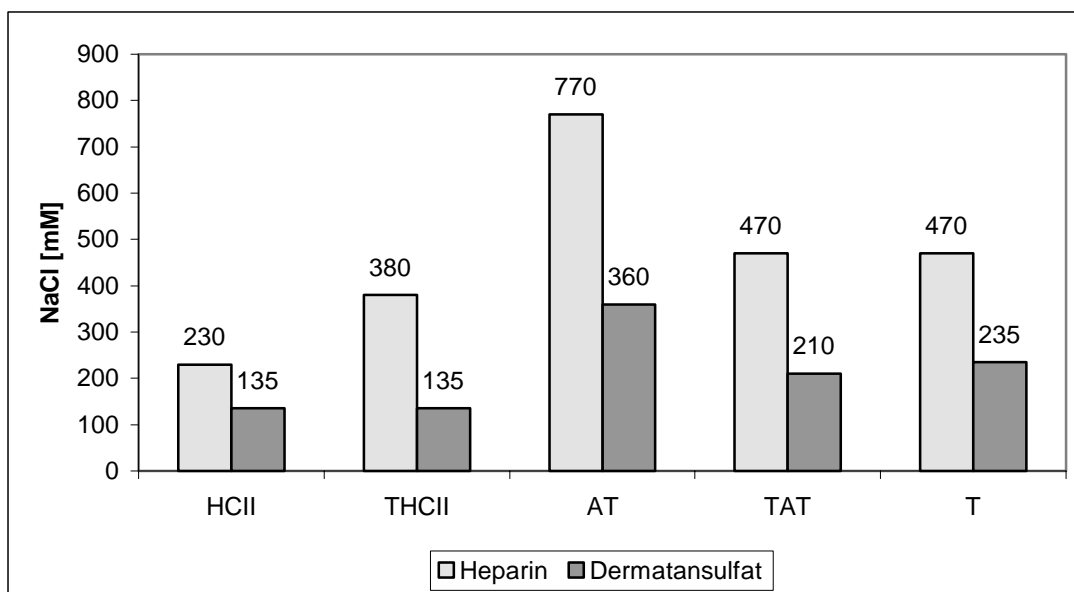


Abb. 66: Vergleich der NaCl-abhängigen Affinität von HCII, Antithrombin (AT) sowie deren Thrombin-komplexe für Heparin und Dermatansulfat.

Die Punkte 1 und 2 stimmen gut mit den bisherigen Befunden in der Literatur überein (Carlström *et al.* 1977). Die Heparinbindungsstelle von AT besitzt daher nach der Komplexie-

¹ Wegen der Unsicherheit über die Reinheit des verwendeten immobilisierten Dermatansulfats (s. Abschn. III.3.2) werden hier vornehmlich die Versuche mit Heparin-Sepharose diskutiert.

ung mit Thrombin eine reduzierte Affinität zu Heparin, (Olson *et al.* 1992, Van Boeckel *et al.* 1994).

Zu Punkt 3:

Thrombin besitzt zwei anionenbindende Exosites (I und II), wobei Exosite II als Heparinbindungsstelle beschrieben wurde (Bode *et al.* 1992) und Exosite I für die Heparinbindung eine untergeordnete Rolle spielt (Olson *et al.* 1991).

Die Heparin-Bindungsstelle von AT verliert hingegen infolge der Komplexbildung ihre hohe Heparin-Affinität (Jordan *et al.* 1979, Olson & Shore 1986). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in einer Konformationsänderung der Heparin-bindenden Helix D, die durch das angrenzende β -Faltblatt A verursacht wird. Letzteres geht durch eine Insertion von Teilen der reaktiven Schleife in ein thermodynamisch stabileres, antiparalleles β -Faltblatt über und begünstigt die niedrigaffine Konformation der Helix D (Carrell *et al.* 1991).

Die Tatsache, daß die Heparin-Affinität des TAT-Komplexes der Affinität von unkomplexiertem Thrombin entspricht, legt auf den ersten Blick den Schluß nahe, daß die Heparin-Bindung des Komplexes über Thrombin erfolgt.

Die Heparin-Affinität von im reaktiven Zentrum gespaltenen AT wird mit 250 mM NaCl (Fish *et al.* 1979) bzw. 430 mM NaCl (Pratt & Church 1992) angegeben. Die Heparin-Affinität eines AT-Komplexes mit dem P1-P14-Tetradekapeptid der reaktiven Schleife beträgt 150 mM NaCl (Björk *et al.* 1992a). Berücksichtigt man zusätzlich, daß Thrombin im Komplex ebenso deformiert vorliegen könnte wie Trypsin im Komplex mit α_1 -Antitrypsin (Huntington *et al.* 2000b), dann muß auch eine reduzierte Heparin-Affinität von komplexiertem Thrombin in Betracht gezogen werden.

Daher ist es gut möglich, daß der TAT-Komplex über AT oder Thrombin allein oder aber über beide Bindungsstellen (AT und Thrombin) an Heparin bindet.

Zu Punkt 4:

Eine reduzierte Heparin-Affinität von Thrombin infolge der Komplexbildung mit HCII ist erst kürzlich beschrieben worden (Maekawa *et al.* 2000).

Vier Ursachen sind für die verringerte Affinität denkbar:

Erstens könnte der N-Terminus von HCII mit Heparin um die Exosite II Bindungsstelle konkurrieren. Dies setzt eine Affinität des N-terminalen Bereichs zur Exosite II voraus, die wegen der entgegengesetzten Nettoladung der entsprechenden Bereiche gegeben sein könnte.

Zweitens wäre eine allosterische Konformationsänderung von Exosite II infolge der kovalenten Komplexbildung mit HCII denkbar. Dafür spricht, daß eine allosterische Wechselwirkung zwischen Exosite II und dem aktiven Zentrum von Thrombin nachgewiesen werden konnte: Die Bindung von Heparin an Exosite II von Thrombin führt zum Zerfall des Thrombin-Komplexes mit der HCII-Mutante L444R (Han & Tollefsen 1998). Auch der bisher einzige Serpin-Enzym-Komplex, dessen Röntgenstruktur bekannt ist (Abb. 3, Huntington *et al.* 2000b), zeigt eine Deformation der Protease. Dies legt eine Deformation der Heparinbindungsstelle (Exosite II) von Thrombin infolge der Komplexbildung nahe.

Drittens könnte die Bindung des N-Terminus von HCII an Exosite I eine allosterisch vermittelte reduzierte Heparin-Affinität der Exosite II bewirken. Auch dafür gibt es Hinweise, da bereits verschiedenartige allosterische Wechselwirkungen zwischen Exosite I und II beschrieben wurden. Die Bindung von Heparin an Exosite II fördert die Bindung von Fibrin-Monomer an Exosite I (Hogg *et al.* 1996). Umgekehrt wurde eine reziproke allosterische Modulation beschrieben, bei der die Bindung eines Liganden (Prothrombin-Fragment 63-116) an Exosite II die Ablösung eines Liganden (Hirudin 54-76) von Exosite-I verursacht (Fredenburgh *et al.* 1997).

Viertens könnte eine räumliche Konstellation, bei der sich Thrombin im THCII-Komplex auf der „Rückseite“ (s. nächster Abschnitt) von HCII befindet, eine verringerte Zugänglichkeit der Exosite II für Heparin zur Folge haben.

Zu Punkt 5:

Die Heparin-Affinität des THCII-Komplexes liegt zwischen der Affinität von unkomplexiertem HCII und Thrombin. Daher könnte sich die Heparin-Affinität der GAG-Bindungsstelle von HCII erhöht und/oder die Heparin-Affinität der Exosite II von Thrombin verringert haben. Die beobachtete Heparin-Affinität von unkomplexiertem HCII ergibt sich aus der intrinsischen Affinität (ohne Konkurrenz mit dem N-Terminus) der Heparinbindungsstelle zu Heparin, in Verbindung mit dem um die Bindungsstelle konkurrierenden N-Terminus.

Die intrinsische Heparin-Affinität läßt sich ohne intramolekulare Konkurrenz mit Hilfe der Deletionsmutante HCII Δ 51-76 bestimmen, die eine Elution bei 860 mM NaCl zeigt (s. Abschn. III.5.2).

Folgendes spricht dafür, daß sich diese hohe intrinsische Heparin-Affinität von HCII in Folge der Komplexbildung verringert: In der reaktiven Schleife gespaltenes HCII besitzt eine erhöhte Temperaturstabilität (Pratt *et al.* 1990), die bei anderen Serpinen nachweislich durch Insertion der reaktiven Schleife in das β -Faltblatt A hervorgerufen wird. Dies macht eine Insertion auch bei HCII wahrscheinlich. Bei AT verursacht diese Insertion eine Verringerung der Heparin-Affinität der an das Faltblatt A angrenzenden, Heparin-bindenden Helix D, die über einen allosterischen Mechanismus hervorgerufen wird (van Boeckel *et al.* 1994).

Teile dieses Mechanismus wurden auch bei HCII nachgewiesen: Bei einem dem Helix-D-Bereich entsprechenden Heparin-bindenden Peptid (HCII 165-195) konnte gezeigt werden, daß durch die Heparinbindung der α -helikale Anteil ansteigt (Whinna & Church 1994).

Über die Heparin-Affinität von inaktiviertem, an der reaktiven Schleife gespaltenem HCII ist bisher nichts bekannt.

Zahlreiche Faktoren beeinflussen jedoch die Heparin-Affinität der Heparin-Bindungsstelle von komplexiertem HCII: i) Die intrinsische Affinität zu Heparin. ii) Die Affinität zum N-Terminus. iii) Die Position des N-Terminus im Komplex. Dieser könnte wegen seiner negativen Ladung mit der GAG-Bindungsstelle von HCII und/oder mit den Exosites I bzw. II von Thrombin wechselwirken. Der N-Terminus bindet zwar im Begegnungskomplex an die Exosite I von Thrombin, wobei er jedoch im stabilen Komplex mit seiner sauren Domäne – auf

Grund der entgegengesetzten Ladung – auch eine Affinität zur basischen Exosite II besitzen könnte.

Zu Punkt 6:

Für den THCII-Komplex der HCII-Mutante (L444R) konnte eine Heparinbindung an Exosite II von Thrombin nachgewiesen werden, die eine Dissoziation des THCII-Komplexes bewirkt (Han & Tollefsen 1998). Die Affinität dieser Bindung wurde dort jedoch nicht untersucht.

Beim Komplex aus Proteinase C Inhibitor (PCI) und Thrombin sinkt die Affinität des Komplexes (562 mM NaCl) etwas unter den Wert von 640 mM NaCl für freies Thrombin. PCI selbst eluiert bei 508 mM NaCl. Die Autoren favorisieren daher die Heparin-Bindung des Komplexes über Thrombin (Pratt & Church 1992).

Um den Ort der Heparin-Bindung im THCII-Komplex zu diskutieren, wäre es nützlich, dessen Struktur zu kennen.

Da bisher keine Röntgenstrukturanalysen für den THCII-Komplex vorliegen, kann es nur Anhaltspunkte für die Struktur geben. Es existieren einige dreidimensionale Modelle von ternären Heparin-Thrombin-Serpin-Komplexen, die auf den Aktivierungsmechanismus durch Heparin abzielen (THCII: Myles *et al.* 1998; TAT: Carrell *et al.* 1995, Grootenhuys *et al.* 1995). Diese ternären Komplexe zeigen das Serpin (AT oder HCII) in einer Orientierung gegenüber dem aktiven Zentrum von Thrombin, bei der die intakte reaktive Schleife des Serpins dem Thrombin zugewandt ist. Dies ist jedoch wahrscheinlich nur der Begegnungs-Komplex, der die Komplexbildung einleitet (vgl. Abb 67). Weiterhin wurden Serpin-Enzym-Komplexe mit partiell inserierten, aber ungespaltenen reaktiven Schleifen modelliert, die eine Translokation der Protease berücksichtigten (Whisstock *et al.* 1996). Neuere Erkenntnisse bestätigen jedoch die Spaltung der reaktiven Schleife, die von Lawrence *et al.* (1995) vorgeschlagen wurde. Für zwei Serpin-Proteinase-Komplexe wurde dies bereits indirekt gezeigt und durch dreidimensionale Modelle illustriert: Trypsin bzw. Urokinase (uPA) gelangen infolge der Insertion der reaktiven Schleife in das β -Faltblatt A des Serpins an das entgegengesetzte, ca. 70 Å entfernte Ende des Inhibitors (Stratikos & Gettins 1999; Fa *et al.* 2000).

Auch die Röntgenstrukturanalyse eines Serpin-Enzym-Komplexes (α_1 -Antitrypsin-Trypsin, Abb. 3, Abschnitt I.2.4) zeigt diese Konfiguration (Huntington *et al.* 2000b). Die Struktur dieses Komplexes offenbart eine Deformation der kovalent gebundenen Protease. Wenn auch Thrombin einer ähnlichen allosterischen Konformationsänderung im Komplex unterliegt, könnte sich dadurch die Heparin-Affinität der Exosite II ändern.

Diese Translokation ist ebenso wie die Acylierung gut abgesichert, wohingegen die Reihenfolge dieser Schritte und noch kontrovers diskutiert wird (Stone & Le Bonniec 1997, Mellet & Bieth 2000) und die Translokation reversibel sein kann (O'Malley & Cooperman 2001). Für diesen Mechanismus ist vermutlich die Beweglichkeit und die direkte Beteiligung der Helix F (zusammen mit deren Verbindungsschleife zum Strang 3 von Faltblatt A) Voraussetzung, da sie einen für die Insertion der reaktiven Schleife wichtigen Bereich im Faltblatt A partiell verdeckt (siehe Abb. 1a u. 69). Für die Beteiligung der Helix F an allosterischen Konformation-

sänderungen gibt es bei AT und α_1 -Antitrypsin deutliche Hinweise (Picard *et al.* 1999, Lee *et al.* 2000). Ein möglicher Ablauf der Thrombin-Inhibition durch HCII ist in Abbildung 67 dargestellt.

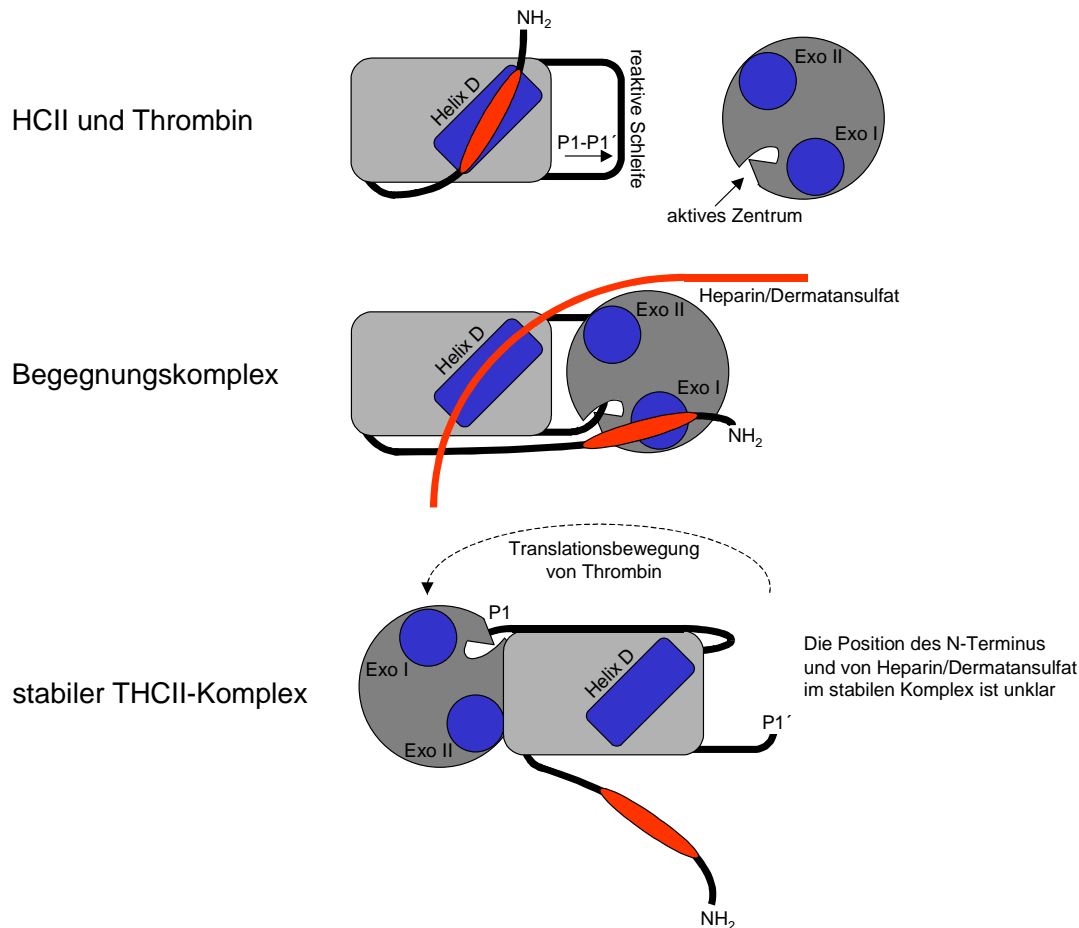


Abb. 67: Modell der Serpin-Enzym-Inhibition (nach: Loebermann *et al.* 1984, Lawrence *et al.* 1995, Huntington *et al.* 2000), übertragen auf HCII und Thrombin unter Berücksichtigung des HCII-Aktivierungsmechanismus nach Ragg *et al.* (1990a). Die positiv geladenen Domänen sind blau, negativ geladene Bereiche rot dargestellt. Im freien HCII bindet dessen N-Terminus mit seiner sauren Domäne an die basische Bindungsstelle im Bereich der Helix D. Heparin oder Dermatansulfat verdrängen diesen, so daß er mit seiner sauren Domäne an die Anionen bindende Exosite I (Exo I) von Thrombin binden kann. Zusätzlich kann Heparin und Dermatansulfat an Exosite II (Exo II) binden, Dermatansulfat jedoch mit geringerer Affinität als Heparin. In diesem Begegnungskomplex erfolgt die Ausbildung einer kovalenten Bindung und die Spaltung der P1-P1'-Bindung. Diese erfolgt durch Acylierung von Serin-195 (Numerierung nach Bode *et al.* 1989) der katalytischen Triade des Thrombins mit dem α -Carbonyl der P1-Aminosäure (Leucin 444) von HCII. Durch die Spaltung der reaktiven Schleife kann sich der N-terminale Rest der reaktiven Schleife in das β -Faltblatt A von HCII einfügen. Dabei beschreibt Thrombin eine Translationsbewegung um HCII herum, während es am N-terminalen P1-Rest der reaktiven Schleife kovalent gebunden bleibt. Der P1-Rest befindet sich dann auf der entgegengesetzten Seite des HCII-Moleküls. Das durch Einfügen der gespaltenen reaktiven Schleife antiparallel strukturierte β -Faltblatt ist die thermodynamisch begünstigte Konformation und trägt dadurch maßgeblich zur Stabilität des Komplexes bei. Die Auswirkung der Komplexbildung auf die Konformation und Zugänglichkeit der basischen Domänen (blau) sind ebenso unbekannt wie die Position des N-Terminus bzw. der Heparin/Dermatansulfat-Bindungsstelle im stabilen Komplex. Die Affinität von Exosite II, die im freien Thrombin Heparin bindet, sinkt jedoch infolge der Komplexbildung.

Eine Verbindung zwischen Serpin und Thrombin über eine Heparin-Brücke könnte die Translokationsbewegung von Thrombin erschweren. Wenn jedoch eine der Heparin-

Bindungsstellen des Komplexes durch die Serpin-Spaltung an Heparin-Affinität verliert, würde die Brücke geschwächt und die Translokation von Thrombin erleichtert. Der Übergang in einen niedrig affinen Zustand ist bei der Heparinbindungsstelle von AT belegt (Jordan *et al.* 1979, Olson & Shore 1986). Beim THCII-Begegnungskomplex existiert jedoch eine zweite Brücke in Form des HCII-N-Terminus, der an die Exosite I von Thrombin bindet. Wenn im Verlauf der THCII-Komplexbildung auch eine Translokation des Thrombins erfolgen sollte (vgl. Abb. 67), muß entweder der N-Terminus so beschaffen sein, daß er die erforderliche Bewegung des Thrombin zuläßt bzw. begünstigt oder aber die Exosite I freigibt. Letzteres setzt im Thrombin einen allosterischen Mechanismus mit Auswirkung auf Exosite I voraus. In anderem Zusammenhang ließ sich bereits eine solche allosterische Wechselwirkung zwischen Exosite I und dem aktiven Zentrum von Thrombin nachweisen. Es konnte gezeigt werden, daß ein dem N-Terminus analoges Peptid (Hirudin 54-65) infolge der Thrombininaktivierung durch AT sich von Exosite I ablöst (Bock *et al.* 1997). Daß dieser Mechanismus einen Beitrag zur Thrombin-Inhibition durch HCII leisten könnte, wurde von den Autoren nicht angemerkt. Eine weitere allosterische Wechselwirkung zwischen Exosite I, verursacht durch Bindung des HCII-Peptid 45-75, und dem aktiven Zentrum wurde ebenfalls bereits beschrieben (Hortin & Trimpe 1991). Die Bindung dieses Peptids wirkt aktivierend auf die Spaltung kleiner chromogener Substratpeptide.

Zusammengefaßt könnte die GAG-katalysierte Thrombin-Inaktivierung durch HCII wie folgt ablaufen (s. auch Abb. 67):

Die Bindung von Heparin an HCII bewirkt die Freisetzung des N-Terminus, der seinerseits an die Exosite I von Thrombin binden kann und damit evtl. eine Konformationsänderung des aktiven Spaltes von Thrombin bewirkt. Das eigentlich für Thrombin ungünstige Pseudo-Substrat HCII mit Leucin in der P1-Position kann durch diese Brückenbildung mit Thrombin leichter gespalten werden und es entsteht ein Acyl-Intermediat. Dies bewirkt evtl. durch einen allosterischen Mechanismus eine Reduktion der Affinität von Exosite I zum N-Terminus von HCII. Dadurch könnte sich der N-Terminus leichter von Exosite I lösen, um die Translokation von Thrombin, verursacht durch Insertion der gespaltenen reaktiven Schleife in β -Faltblatt A auf die Rückseite von HCII zu erleichtern. In dieser endgültigen Position wird der Acyl-Intermediat-Zustand stabilisiert. Dieser stabile THCII-Komplex besitzt eine geringere Heparin-Affinität als die Exosite II von nicht komplexiertem Thrombin. Dadurch wird die katalytische Wirkung von Heparin erhöht, da gebundenes Heparin schneller freigesetzt wird und so an weiteren Inhibitionsreaktionen teilnehmen kann.

Bezüglich der HCII-Thrombin-Komplexbildung bleiben jedoch zahlreiche Fragen offen:

- Welche Struktur hat der THCII-Komplex? Wo befindet sich der N-Terminus von HCII im THCII Komplex: Bindung an Exosite I oder II oder an die GAG-Bindungsstelle von HCII?
- Warum verringert sich die Heparin-Affinität von Thrombin im THCII-Komplex?
- Welche Heparin-Affinität besitzt HCII nach der Spaltung der reaktiven Schleife?

5 Heparin-Bindung von HCII-Varianten

Es konnte gezeigt werden, daß posttranslationale Modifikationen die Heparin-Affinität von HCII-Varianten beeinflussen (Tab. 18). Die biologische Funktion von HCII als Thrombin-Inhibitor hängt von der Beschleunigung der Aktivierung durch GAGs wie Heparin oder Dermatan-sulfat ab. Die Geschwindigkeit der Thrombin-Inaktivierung ist sowohl von der Konzentration als auch von der Affinität des aktivierenden GAGs abhängig (Pratt *et al.* 1992). Demnach wirkt sich die durch posttranslationale Modifikationen beeinflusste Heparin-Affinität von HCII auf die physiologische Inhibitor-Wirkung gegenüber Thrombin aus.

Tab. 18: Zusammenfassung der Heparin-Affinität von HCII-Varianten und deren mutmaßliche Ursachen. Die jeweilige Affinität wurde mit Hilfe der Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie durch Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten ermittelt. Die angegebenen Mittelwerte (MW) mit den entsprechenden Standardabweichungen (in Klammern) beruhen auf n Einzelmessungen.

HCII-Variante	Heparin-Affinität c(NaCl) mM	n	mutmaßliche Ursache (Unterschied zu Plasma-HCII)
Plasma-HCII	210 (± 15)	4	-
HCII (CHO)	270 (± 11)	6	proximale Fucosylierung (?)
HCII, Tunicamycin (CHO)	330 (± 2,5)	2	keine N-Glykane
HCII, Chlorat (CHO)	420 (± 10)	2	keine Tyrosin-Sulfatierung
<i>E. coli</i> WT	440 *	1	keine N-Glykane und Tyrosin-Sulfatierungen
<i>E. coli</i> Δ51-76	840 (± 70)	6	keine N-Glykane und Tyrosin-Sulfatierungen, keine Konkurrenz mit dem N-Terminus um die GAG-Bindungsstelle

* vgl. Abschnitt II.4.1

5.1 Einfluß der N-Glykane auf die Heparin-Affinität

Um den Einfluß der N-Glykane auf die Heparin-Bindung zu untersuchen, wurde HCII benötigt, das keine N-Glykane trägt, aber Tyrosin-Sulfatierungen aufweist. Eine enzymatische N-Deglykosylierung von Plasma- oder CHO-HCII mit PNGase-F kam aus experimentellen Gründen nicht in Frage: Die Behandlung mit PNGase F wird wegen der besseren Zugänglichkeit der Spaltstelle in Gegenwart der denaturierenden Reagenzien SDS und NP40 durchgeführt. Das resultierende HCII ist daher Detergenz-komplexiert und eignet sich nicht mehr für die Heparin-Affinitätsmessung, diente aber als Vergleichsmaterial im Western-Blot.

Mit Tunicamycin konnte N-glykanfreies HCII produziert werden, das bei der Heparin-Affinitätschromatographie eine um 60 mM NaCl erhöhte Heparin-Affinität hatte (s. Tab. 18). Die Ursache dafür könnte die positivere Nettoladung von HCII sein, da mit den N-Glykanen die negativen Ladungen der Sialinsäuren entfernt wurden. Der Sialylierungsstatus ist meistens uneinheitlich und trägt damit maßgeblich zur Ladungs-Mikroheterogenität von glykosylierten Proteinen bei (Hermentin *et al.* 1996). Durch isoelektrische Fokussierung ließ sich diese Mikroheterogenität auch für HCII nachweisen (Kim *et al.* 1988, s. auch Abb. 64 u. 65 in Abschn. III.5.4). Der Einfluß der negativen Ladungen auf die Heparin-Bindung der N-Glykane ließe sich durch Sialidase-Verdau von HCII und anschließender Heparin-Affinitätschromatographie

gezielt überprüfen. Ein Sialidaseverdau des verwandten Serpins AT wirkt sich jedoch nicht auf die Heparin-Affinität aus (Peterson & Blackburn 1985).

Der Einfluß der Sialinsäuren auf die Heparin-Bindung scheint auch aus folgenden Überlegungen gering zu sein: Das glykosylierte und daher Ladungs-mikroheterogene HCII müßte über einen breiteren NaCl-Bereich eluieren, als das glykanfreie und damit nicht mikroheterogene HCII. Ein solcher Effekt war aber nicht zu erkennen (vgl. Abb. 59 und 60). Der Sialylierungsstatus von HCII, der zwar eine Rolle für die Glykoprotein-Clearance (Flesher *et al.* 1995) und zahlreiche weitere Funktionen (Varki 1993) spielen könnte, wirkt sich demnach kaum auf die Heparin-Bindung bzw. die Thrombin-Inhibition aus.

Daher müßte der Grund für das veränderte Heparin-Bindungsverhalten sterische Ursachen haben, die in der räumlichen Struktur der N-Glykane begründet sind.

Bei dem verwandten Serpin AT konnte ebenfalls ein Einfluß der Glykosylierung auf die Heparin-Bindung festgestellt werden, deren Ursachen bereits gut untersucht sind und sich u. U. auf HCII übertragen lassen.

Ein verändertes Glykosylierungsmuster von rekombinantem AT führt zu abweichenden Heparin-Affinitäten, wobei mit steigendem Umfang der N-Glykosylierung die Heparin-Affinität sinkt. Humanes Plasma-AT_α ist an den Asparagin-Resten 96, 135, 155 und 192 N-glykosyliert. Die β-Isoform bindet aufgrund eines fehlenden N-Glykans am Asparagin 135 erheblich fester an Heparin (Peterson & Blackburn 1985, Picard *et al.* 1995). Sowohl das Vorhandensein als auch der Verzweigungsgrad und damit die Größe des N-Glykans führen zu einer reduzierten Heparin-Affinität (BHK-Zellen: Fan *et al.* 1993, CHO-Zellen: Björk *et al.* 1992b, transgene Ziegen-Milch: Edmunds *et al.* 1998).

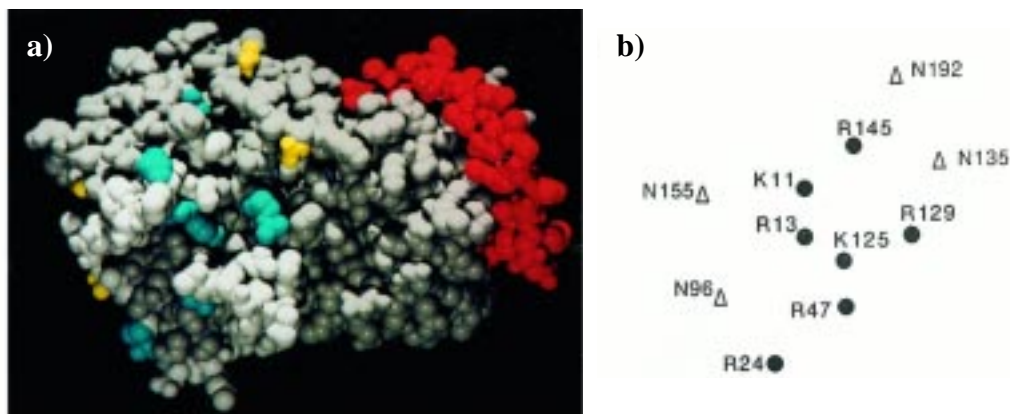


Abb. 68: AT-Modell. **a)** Kalottenmodell. Basische Aminosäuren der Heparin-Bindungsstelle: blau; Asparagine der N-Glykosylierungsstellen: gelb; reaktive Schleife: rot; **b)** Zuordnung der Positionen der Heparin-bindenden (●) und N-glykosylierten (Δ) Aminosäuren (entnommen aus: Ersdal-Baju *et al.* 1997)

Varianten des N-Glykans an Asparagin 155 führen zu veränderter Heparin-Affinität, wobei eine Fucosylierung zur Verringerung (Garone *et al.* 1996) und ein Oligo-Mannose-Typ an dieser Position zur Erhöhung der Heparin-Affinität führt (Edmunds *et al.* 1998).

Die Position der N-Glykane wirkt sich ebenfalls auf die Heparin-Bindung aus. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der relativen Entfernung des N-Glykans zur Heparin-Bindungsstelle und der Heparin-Affinität der entsprechenden AT-Varianten festgestellt wer-

den (Olson *et al.* 1997). Den größten Einfluß hat das N-Glykan an Asparagin 135, da es sich offensichtlich von den vier N-Glykanen in der geringsten Entfernung zur Heparin-Bindungsstelle befindet (Abb. 68).

Bei den Positionen der N-Glykane gibt es zwischen AT und HCII keine Übereinstimmungen. Allerdings liegen bei beiden Serpinen die N-Glykane topologisch auf der gleichen Seite des Proteins. Beim HCII befindet sich das N-Glykan in Position 30 in einer Entfernung von 20 Aminosäuren vor der sauren Domäne des N-Terminus. Das N-Glykan in Position 169 liegt unmittelbar vor der GAG-Bindungsstelle, und zwar vier Aminosäuren vor Lysin 173 (Abb. 69). Wegen der Nähe zum ausschließlich Heparin-bindenden Lysin 173 (Whinna *et al.* 1991) dürfte die sterische Behinderung der Heparin-Bindung größer als die der Dermatansulfat-Bindung sein. Das N-Glykan in Position 368 befindet sich vermutlich in zu großer Entfernung von der GAG-Bindungsstelle, um direkt sterisch auf die GAG-Bindung Einfluß zu nehmen.

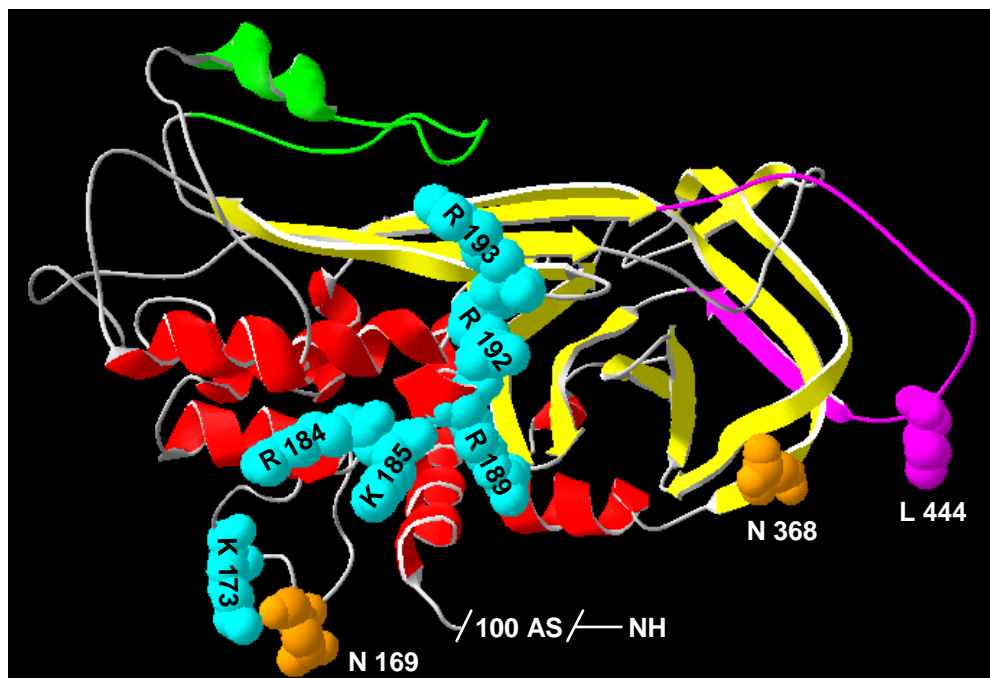


Abb. 69: HCII-Modell in Band/Kalotten-Darstellung ohne den N-Terminus (100 Aminosäuren), der sich aufgrund mangelnder Homologie nicht modellieren läßt (s. Abschn. II.6.1). Die N-glykosylierten Asparagin-Reste 169 und 368 sind orange dargestellt und die an der GAG-Bindung beteiligten basischen Aminosäuren im Bereich der α -Helix D blau. α -Helices: rot; β -Faltblätter: gelb; reaktive Schleife mit dem P1-Rest L444: violett; Helix-F-Bereich: grün;

Alle drei N-Glykane liegen jedoch in einem Bereich, der für die intramolekulare Wechselwirkung mit dem N-Terminus in Frage kommt. Damit könnten sie indirekten Einfluß auf die Heparin-Bindung nehmen.

Die GAG-Affinität könnte auch durch zusätzliche Kofaktoren beeinflusst werden wie z.B. durch zweiwertige Kationen, wie es für die Ca-Spirulan-Bindung an HCII der Fall ist (Hayakawa *et al.* 1996 und 2000). Auch ein HCII-aktivierendes sulfatiertes Polysaccharid (AFE-HCD) enthält Ca^{2+} und Mg^{2+} (Hayashi *et al.* 1997). Der Einfluß von Zn^{2+} auf die Heparin-Affinität von HCII konnte bereits gezeigt werden (Eckert, unveröffentlichte Daten).

5.2 Einfluß der Tyrosin-Sulfatierungen auf die Heparin-Affinität

Die Fähigkeit von CHO-Zellen Tyrosin-Sulfatierungen vornehmen zu können, wurde von Mikkelsen *et al.* (1991) untersucht und bestätigt.

In Gegenwart des Sulfatierungs-Inhibitors Chlorat produzierten CHO_{HCII}-Zellen einen großen Anteil HCII, das stärker an Heparin bindet. Der Anteil des höher affinen HCII stieg, wenn Chlorat in höherer Konzentration in Verbindung mit sulfatfreiem Medium eingesetzt wurde (vgl. Abb. 62 u. 63). Wird im Medium zusätzlich die Konzentration von Cystein und Methionin auf 1 % reduziert, kann eine über 90%ige Inhibition erzielt werden, da sich der interne Sulfatpool der Zellen offensichtlich aus schwefelhaltigen Aminosäuren regenerieren kann (Bauerle & Huttner 1986).

Die Tyrosin-Sulfate (Tyrosin 60 und 73) liegen in einer sauren Domäne des N-Terminus, die intramolekular an die GAG-Bindungsstelle von HCII bindet (vgl. Abb. 70a). Eine Mutation von Tyrosin 60 zu Phenylalanin (Y60F) führt zu einer verringerten Heparin- und Dermatan-sulfat-vermittelten Komplexbildung mit Thrombin (Ragg *et al.* 1990b) und könnte daher für die Wechselwirkung wichtig sein. Bei dem strukturähnlichen Hirudin-Peptid 54-65 konnte eine 17fach höhere Affinität für die Exosite I von Thrombin festgestellt werden, wenn es eine Sulfatgruppe am Tyrosin 63 trägt (Anderson *et al.* 2000). Die Mutation des zweiten Tyrosins (Y73F) fördert die Komplexbildung (Ragg *et al.* 1990b), vermutlich indem die intramolekulare Bindung des N-Terminus zur GAG-Bindungsstelle geschwächt wird. Demnach haben die beiden Positionen der Tyrosin-Sulfatierung unterschiedliche Funktionen. Die Doppelmutante Y60F/Y73F zeigte ebenfalls eine verringerte Thrombin-Komplexbildungsrate (Ragg *et al.* 1990a,b).

N-glykanfreies und unsulfatiertes HCII aus *E. coli* besitzt eine höhere Heparin-Affinität als glykosyliertes Plasma- und CHO-HCII, aber auch als N-glykanfreies (aber sulfatiertes) HCII. Diese hohe Affinität wird demnach durch fehlende Tyrosin-Sulfatierungen verursacht.

Für die höhere Affinität des unsulfatierten HCII gibt es zwei Möglichkeiten: 1. Die zwei fehlenden negativen Ladungen führen lediglich wegen der positiveren Nettoladung des gesamten Proteins zu einer festeren (unspezifischen) Bindung an die negativ geladene Heparin-Sepharose-Matrix. 2. Die fehlenden negativen Ladungen schwächen spezifisch die intramolekulare Bindung des N-Terminus an die GAG-Bindungsstelle, so daß letztere leichter zugänglich wird und Heparin fester binden kann. In der Literatur gibt es Beispiele von HCII-Mutanten mit ausgetauschten oder deletierten geladenen Aminosäuren, die nicht zu einer veränderten Heparin-Affinität führten. (R103L, R189H: Blinder & Tollefsen 1990; R200A/E: Ciaccia *et al.* 1997a). Daher ist die spezifische Wechselwirkung der sulfatierten Tyrosine mit der GAG-Bindungsstelle die wahrscheinliche Ursache für die höhere Heparin-Affinität von HCII aus Chlorat-behandelten CHO-Zellen.

5.3 Modell der Heparin-Bindungsstelle von HCII

Die Untersuchungen zur Heparin-Affinität von HCII lassen sich in einem Modell zusammen-

fassen (Abb. 70). Die intrinsische Heparin-Affinität der Heparinbindungsstelle von HCII konnte mit der in *E. coli* exprimierten Deletionsmutante HCII Δ 51-76 ermittelt werden. Sie besitzt eine mit AT vergleichbar hohe Heparin-Affinität, da sie von Heparin-Sepharose bei 860 mM NaCl eluiert. Im Gegensatz zu AT wird dazu bei HCII jedoch keine spezifische Saccharid-Sequenz benötigt. Diese hohe Affinität sinkt infolge von intramolekularen Wechselwirkungen und posttranslationalen Modifikationen auf 210 mM NaCl (HCII aus Blutplasma) (Abb. 70a u.b). Drei unterschiedliche Mechanismen sind vermutlich daran beteiligt.

1. **Kompetition:** Die saure Domäne konkurriert mit Heparin um die GAG-Bindungsstelle.
2. **ionische Wechselwirkung:** Zwei Tyrosin-Sulfatreste verstärken die Bindung der N-terminalen sauren Domäne mit der basischen GAG-Bindungsstelle.
3. **sterische Behinderung:** Ein oder mehrere N-Glykane, vermutlich besonders in Position 169, verringern die Zugänglichkeit zur Heparin-Bindungsstelle.

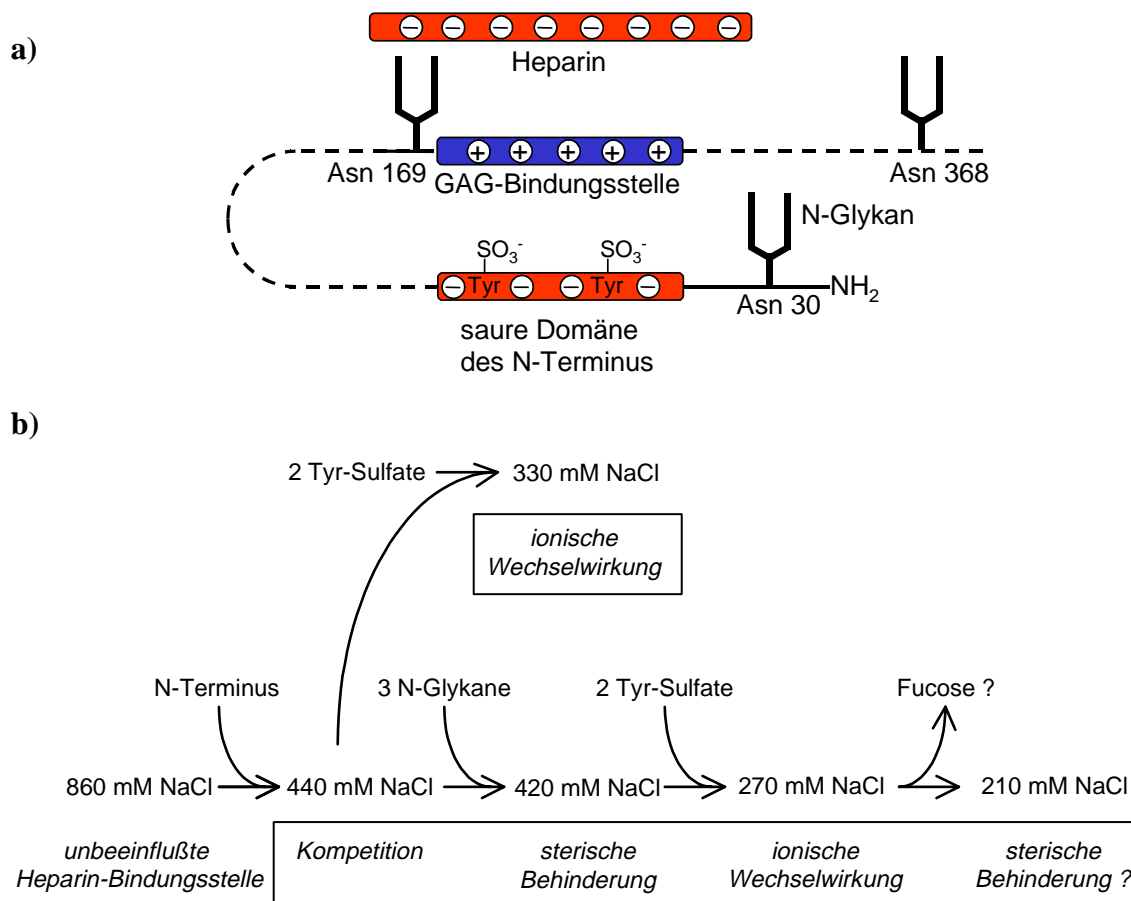


Abb. 70: Modell der sukzessiven Verringerung der Heparin-Affinität der Heparin-Bindungsstelle von HCII (a) durch intramolekulare Wechselwirkungen und posttranslationalen Modifikationen (b). Die NaCl-Konzentrationen der Elution von Heparin-Sepharose wurde mit folgenden HCII-Varianten ermittelt: HCII Δ 51-76 aus *E. coli* (860 mM), WT-HCII aus *E. coli* (440 mM), HCII aus Chlorat-behandelten CHO-Zellen (420 mM), HCII aus Tunicamycin-behandelten CHO-Zellen (330), CHO-HCII (270 mM), Plasma-HCII (210 mM).

V Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluß der posttranslationalen Modifikationen von Heparinkofaktor II (HCII) auf die Heparin-Bindung nachgewiesen werden. Auch die Bildung des stabilen 1:1-Komplexes von HCII mit Thrombin beeinflusste die Bindung an Heparin. Mit Hilfe einer HCII-Deletionsmutante (HCII Δ 51-76) ließ sich eine Immunfluoreszenz-Methode etablieren, die HCII-aktivierende Glykosaminoglykane (Heparin und Dermatan-sulfat) in der extrazellulären Matrix lokalisiert.

HCII Δ 51-76 mit deletierter saurer Domäne des N-Terminus wurde in *E. coli* im 5-l-Maßstab exprimiert. Aufgrund einer sehr hohen Affinität zu Heparin eignete sich HCII Δ 51-76 besonders für den Immunfluoreszenz-Nachweis von HCII-bindenden Glykosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix.

Mit metabolischen Inhibitoren konnten posttranslationale Modifikationen von HCII in Zellkulturen gezielt unterdrückt werden. Die Inhibition der N-Glykosylierung mit Tunicamycin erzeugte in CHO- und HepG2-Zellen HCII mit höherer Heparin-Affinität. Die Inhibition der Tyrosin-Sulfatierung durch Chlorat erhöhte die Heparin-Affinität ebenfalls.

Zur Analyse der Heparin-Bindung wurden Affinitätschromatographie-Säulen mit immobilisiertem Heparin verwendet und die NaCl-Konzentration bestimmt bei der die Proteine eluieren. HCII eluierte von Heparin-Sepharose bei 210 mM NaCl, Thrombin bei 480 mM und der Thrombin-HCII-Komplex bei 380 mM. Dies ließ den Schluß zu, daß sich die Heparin-Bindungsstelle von Thrombin durch die Komplexbildung verändert haben muß, da sich dessen Heparin-Affinität infolge der Komplexbildung verringert hat.

Die Struktur sowie die Anzahl der N-Glykane und der sulfatierten Tyrosin-Reste von HCII konnte durch eine Kooperation mit der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig von H. S. Conradt und Mitarbeitern aufgeklärt werden. Aus humanem Plasma gereinigtes HCII besitzt drei überwiegend biantennäre fast vollständig (α 2 \rightarrow 6)-sialylierte Glykane vom komplexen Typ. Etwa 10 % der N-Glykane sind triantennär und tragen aufgrund einer peripheren Fucosylierung Sialyl-Lewis^x-Motive. Zwei Tyrosin-Reste im N-Terminus sind annähernd vollständig sulfatiert und die Methionin-Reste von HCII teilweise oxidiert. Die rekombinante Expression von humanem HCII in CHO-Zellen erzeugte ein Protein mit ebenfalls sulfatierten Tyrosin-Resten und drei überwiegend biantennären N-Glykanen vom komplexen Typ. Diese sind jedoch nicht peripher, sondern proximal fukosyliert und die terminalen Sialinsäuren (α 2 \rightarrow 3)-gebunden.

Anhand der untersuchten HCII-Varianten konnte ein Modell entworfen werden, das die Ursachen der relativ geringen Heparin-Affinität von humanem Plasma-HCII erklärt. Durch additive Effekte der posttranslationalen Modifikationen und durch intramolekulare Konkurrenz sinkt die Affinität der Glykosaminoglykan-Bindungsstelle:

Die intrinsische (nicht durch den N-Terminus, N-Glykane und Tyrosin-Sulfatierung herabgesetzte) Heparin-Affinität der GAG-Bindungsstelle von HCII ist sehr hoch und mit der Heparin-Affinität von Antithrombin vergleichbar. Der intrinsischen Affinität entspricht die Elution von Heparin-Sepharose bei 860 mM NaCl, wie es die unsulfatierte nicht N-glykosylierte Deletionsmutante HCII Δ 51-76 aus *E. coli* zeigt. Durch Konkurrenz mit dem funktionstüchtigen N-Terminus (Wildtyp-HCII aus *E. coli*) sinkt die Heparin-Affinität, und die Elution erfolgt bereits bei 440 mM NaCl. Die N-Glykosylierung von HCII bewirkt eine weitere (leichte) Herabsetzung der Heparin-Affinität durch sterische Behinderung, so daß N-glykosyliertes aber nicht sulfatiertes HCII (Chlorat-inhibiertes HCII) bei 410 mM NaCl eluiert. HCII ohne N-Glykane aber mit Tyrosin-Sulfaten eluiert bereits bei 330 M, da die beiden Tyrosin-Sulfate in der sauren Domäne des N-Terminus zur dessen intramolekularen ionischen Wechselwirkung mit der basischen Glykosaminoglykan-Bindungsstelle beiträgt. Dies verstärkt die Konkurrenz zwischen dem N-Terminus und Heparin um die Bindungsstelle. HCII aus CHO-Zellen, das N-Glykane und Tyrosin-Sulfate besitzt, eluiert bereits bei 270 mM NaCl und hat damit im Vergleich zu Plasma-HCII (210 mM NaCl) eine etwas höhere Heparin-Affinität. Möglicherweise verstärkt die proximale Fukosylierung des CHO-HCII die schwächende Wirkung der N-Glykane auf die Heparin-Bindung.

Diese Ergebnisse führen zu einem besseren Verständnis der molekularen Struktur und allosterischen Dynamik von HCII. Der für das hochaffine HCII Δ 51-76 etablierte Immunfluoreszenz-Nachweis könnte einen Beitrag zur Aufklärung der bisher unbekanntem physiologischen Rolle des Inhibitors leisten. Beispielsweise ließe sich diese Methode für das Auffinden von HCII oder dessen Thrombin-Komplexen im (fixierten) Gewebe einsetzen. Die rekombinante Expression in CHO-Zellen erzeugt – anders als die Expression des Wildtyps in *E. coli* – ein Protein mit einer dem Plasma-HCII vergleichbaren Heparin-Affinität, da die N-Glykosylierungen und Tyrosin-Sulfatierungen von diesen Zellen durchgeführt werden. Dieser Aspekt dürfte im Falle eines therapeutischen Einsatzes von (rekombinantem) HCII von Bedeutung sein.

VI Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro-, *10 ⁻⁶
Abb.	Abbildung
AC	Affinitätschromatographie
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
AT	Antithrombin (Synonym: ATIII, Antithrombin III)
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> / Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	<i>Crosslinker</i> der Acrylamid-Monomerlösung: N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis)
C1-I.	C1-Inhibitor
ca.	<i>circa</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CHO _{HCI}	CHO-Zellen stabil transfiziert mit der c-DNA für humanen Heparinkofaktor II
CHO-HCII	rekombinanter Heparinkofaktor II aus CHO _{HCI} -Zellen
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i> Agglutinin, Concanavalin
cv	<i>column volume</i>
d	Tag
DASS	<i>defined antigenic substrate spheres</i> , Antigen-gekoppelte-Partikel für Immunfluoreszenz
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dermatansulfat
DSA	<i>Datura stramonium</i> Agglutinin
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluoreszein
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethydiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
evtl.	eventuell
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	fibroblast growth factor
FITC-HCII	mit Fluoresceinisothiocyanat markiertes HCII
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fn	Fibronectin
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Fuc	L(-)Fukose
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	D(+)-Galaktose
GalNAc	N-Acetyl-D(+)-Galaktosamin
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
Glc	D(+)-Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde
HCII	Heparinkofaktor II (Synonym: Leuserpin-2)
HCV	Hepatitis C Virus
HepG2-HCII	Heparinkofaktor II aus HepG2-Zellen (humane Leberzelllinie)

HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPAEC-PAD	<i>high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSA	humanes Serumalbumin
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
k	Kilo-, $\times 10^3$
kB	Kilobasen
k.A.	keine Angaben
kD	Kilo-Dalton, relative Molekülmasse $\times 10^3$
l	Liter
LB	Lennox L Broth Base
LMW	<i>low molecular weight</i>
log-Phase	logarithmische Wachstumsphase
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
m	Meter
m	Milli-, $\times 10^{-3}$
M	molar, mol/l
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation with time of flight detector</i>
Man	D(+)-Mannose
max.	maximal
MES	3-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MTX	Methotrexat
MW	Molekülmasse (<i>molecular weight</i>)
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> / Molekülmassen-Ausschluß (Maß für Porengröße)
N	Asparagin
n	Nano-, $\times 10^{-9}$
n. n.	nicht nachweisbar
NaCl	Natriumchlorid
NCS	<i>newborn calf serum</i>
NeuAc	N-Acetyl-Neuraminsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor 1
PB	20 mM Na-Phosphatpuffer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> / phosphatgepufferte Salzlösung
PC	<i>personal computer</i>
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PG	Proteoglykan
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	Peptid-N ⁴ -(Acetyl- β -Glukosaminy)Asparagin-Amidase
POD	Peroxidase
PP	Polypropylen
PSGL-1	P-Selektin-Glykoproteinligand-1
PTFE	Polytetrafluorethylen
Ref.	Referenz
RI	Rinder-Insulin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat

SNA	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
T	Threonin
T	Gesamt-Konzentration (w/v) der Acrylamid-Monomere (Acrylamid + N,N', Methylenbisacrylamid)
tPA	tissue-type Plasminogenaktivator
Tab.	Tabelle
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TFMS	Trifluormethansulfonsäure
THCII	Thrombin-Heparinkofaktor-II-Komplex
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UF	Ultrafiltration
uPA	Urokinase (Plasminogenaktivator)
UpM	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
V	Valin
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Aminosäuren: Drei- und Einbuchstaben-Code

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Aspartat
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutamat
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

VII Chemikalienliste

2D-Standard	Biorad
Ampicillin	Sigma
Anti-HCII-Antikörper 188/2/1, monokl. IgG 2b aus gefälltem Maus-Ascites	Hoechst
Anti-HCII-Antikörper 92/2/12, monokl. Antikörper IgG1, POD-Konjugat	Hoechst
Anti-human-Antithrombin III aus Kaninchen, 900248	Hoechst
Anti-human-HCII, Kan 1, Abnahme 7, 02.01.89, Kaninchenserum	Hoechst
Anti-human-Thrombin aus Kaninchen (Ch.-B.: 62HR/08)	Hoechst
Anti-Kaninchen-Ig aus Esel, Peroxidase-Konjugat (NA934)	Amersham
Antithrombin (602434)	Boehringer Mannheim
Asparagin*H ₂ O	Serva
BaCl ₂	Merck
BCA-Assay	Pierce
Benzamidin (B6506)	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA) standard grade	Serva
Bromphenolblau	Sigma
CaCl ₂	Merck
Carbenicillin	Novagen
Chromozym TH (206849)	Boehringer Mannheim
Complete-Mini	Boehringer Mannheim
Coomassie R350	Pharmacia
Cystein*HCl	Merck
Cystin	Merck
DAPI	Serva
Dermatansulfat (C-3788)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO), für die Spektroskopie	Merck
DMEM/F12 (32500)	Gibco
DMEM/F12, sulfatfrei (D9785)	Sigma
DNase I from Bovine Pancreas	Amresco
DTAF-konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG(H+L) (115-015-062)	Dianova
Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium (DMEM) (31600)	Gibco/Life Technologies
ECL-Detektionslösung (RPN 2106)	Amersham
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol, 96 %	Merck
Ethylendiamintetraacetat-Na ₂ (EDTA-Na ₂)	Merck
Fibronectin aus Rinderplasma (33010-018)	Gibco/Life Technologies
Fluoresceinisothiozyanat, Isomer I (F7250)	Sigma
Fötale Kälberserum (10106-169)	Gibco/Life Technologies
Glucose	Sigma
Glutamin	Merck
Glycerin (87 %)	Merck
Glycin	Baker
Ham´s F12 (21700)	Gibco/Life Technologie
HCl	Baker
Heparin (H3393)	Sigma
Heparin-Sepharose CL-6B	Pharmacia
Histidin*HCl*H ₂ O	Merck
Isoleucin	Merck
IPG-Puffer	Pharmacia
Isopropanol	Merck
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Sigma
KCl	Fluka
KH ₂ PO ₄	Fluka
Lennox L Broth Base (12780-029)	Gibco/Life Technologies
Leucin	Merck
LMW- Molekulargewichtsmarker	Pharmacia
Lysin	Merck

2-Mercaptoethanol	Sigma
MEM Alpha Medium ohne Nukleoside (12000)	Gibco/Life Technologies
MES, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (M8250)	Sigma
Methionin	Merck
MgCl ₂	Merck
MnCl ₂	Merck
MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)	Fluka
Mowiol	Hoechst
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	Fluka
Na-Chlorat (S3171)	Sigma
NaCl z.A.	Riedel de Haen
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaHCO ₃	Riedel de Haen
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	ICN
NH ₄ OH	Baker
Nonidet P40	Fluka
PE 8100	BASF
Penicillin G (P-3032)	Sigma
Phenylalanin	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)(P7626)	Sigma
PNGase F aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Boehringer Mannheim
Polybren ((H9268)	Sigma
Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000)	Sigma
Prolin	Merck
Rinderinsuin	Sigma
Serin	Merck
Silikonöl M100	Roth
Sojabohnen-Trypsininhibitor (T9003)	Sigma
Source Plasma, for manufacturing use only	Sera-Tec Biologicals
Standard-Human-Plasma (ORKL 12)	Behring
Streptomycin (722K779117)	Merck
Thrombin (T1063, T6759)	Sigma
TMB Microwell Peroxidase System	Kirkegaard & Perry, Dunn
Transferrin (82-349-1)	Bayer
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Base	USB
Triton X-100	Serva
Tryptophan	Merck
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma
Trypsin	Sigma
Tunicamycin (T7765)	Sigma
Tween 20, pure	Serva
Tyrosin	Merck
Valin	Merck
Zitronensäure	

VIII Literaturverzeichnis

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979)
Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.
Nature **282**, 615-616.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994)
Molecular biology of the cell.
3rd Ed. Garland Publishing, New York.
- Altmann F, Staudacher E, Wilson IBH, März L (1999)
Insect cells as host for the expression of recombinant glycoproteins.
Glycoconjugate J. **16**, 109-123.
- Amersham Pharmacia Biotech AB (1999)
Protein Purification Handbook.
- Anderson PJ, Nasset AT, Dharmawardana KR, Bock PE (2000)
Characterization of Proexosite I on Prothrombin.
J. Biol. Chem. **275**, 16428-16434.
- Atchley WR, Lokot T, Wollenberg K, Dress A, Ragg H (2000)
An evolutionary classification of the serpin proteins.
eingereicht
- Austin RC, Rachubinski RA, Fernandez-Rachubinski F, Blajchman MA (1990)
Expression in a cell-free system of normal and variant forms of human antithrombin III. Ability to bind heparin and react with alpha-thrombin.
Blood **76**, 1521-1529.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore D, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1992)
Current Protocols in Molecular Biology.
Wiley, New York, Supplement 18, Unit 16.14.
- Baeuerle PA, Huttner WB (1986)
Chlorate - a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **141**, 870-877.
- Baneyx F (1999)
Recombinant protein expression in Escherichia coli.
Curr. Opin. Biotechnol. **10**, 411-421.
- Bar-Shavit R, Eldor A, Vlodaysky I (1989)
Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix.
Protection and expression of functional properties.
J. Clin. Invest. **84**, 1096-1104.
- Barnes D, Sato G (1980)
Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.
Anal. Biochem. **102**, 255-270.
- Bauman SJ, Church FC (1999)
Enhancement of heparin cofactor II anticoagulant activity.
J. Biol. Chem. **274**, 34559-34565.
- Becker DL, Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI
Exosites 1 and 2 are essential for protection of fibrin-bound thrombin from heparin-catalyzed inhibition by antithrombin and heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **274**, 6226-6233.

- Beisswanger R, Corbeil D, Vannier C, Thiele C, Dohrmann U, Kellner R, Ashman K, Niehrs C, Huttner WB (1998)
Existence of distinct tyrosylprotein sulfotransferase genes: molecular characterization of tyrosylprotein sulfotransferase-2.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**, 11134-11139.
- Bellart J, Gilabert R, Cabero L, Fontcuberta J, Monasterio J, Miralles RM (1998)
Heparin cofactor II: a new marker for pre-eclampsia.
Blood Coagulation and Fibrinolysis **9**, 205-208.
- Bendayan P, Boccalon H, Dupouy D, Boneu B (1994)
Dermatan sulfate is a more potent inhibitor of clot-bound thrombin than unfractionated and low molecular weight heparins.
Thromb. Haemost. **71**, 576-580.
- Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M (1999)
Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans.
Annu. Rev. Biochem. **68**, 729-777.
- Berry L, Andrew M, Post M, Ofosu F, O'Brodovich H (1991)
A549 lung epithelial cells synthesize anticoagulant molecules on the cell surface and matrix and in conditioned media.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **4**, 338-346.
- Bertina RM, van der Linden IK, Engesser L, Muller HP, Brommer EJ (1987)
Hereditary heparin cofactor II deficiency and the risk of development of thrombosis.
Thromb. Haemost. **57**, 196-200.
- Björk I, Ylinenjärvi K, Olson ST, Bock PE (1992a)
Conversion of antithrombin from an inhibitor of thrombin to a substrate with reduced heparin affinity and enhanced conformational stability by binding of a tetradecapeptide corresponding to the P1 to P14 region of the putative reactive bond loop of the inhibitor.
J. Biol. Chem. **267**, 1976-1982.
- Björk I, Ylinenjärvi K, Olson ST, Hermentin P, Conradt HS, Zettlmeissl G (1992b)
Decreased affinity of recombinant antithrombin for heparin due to increased glycosylation.
Biochem. J. **286**, 793-800.
- Blackwell JR, Horgan R (1991)
A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form.
FEBS Letters **295**, 10-12.
- Blinder MA, Andersson TR, Abildgaard U, Tollefsen DM (1989)
Heparin cofactor II_{Oslo}. Mutation of Arg-189 to His decreases the affinity for dermatan sulfate.
J. Biol. Chem. **264**, 5128-5133.
- Blinder MA, Marasa JC, Reynolds CH, Deaven LL, Tollefsen DM (1988)
Heparin cofactor II: cDNA sequence, chromosome localisation, restriction fragment polymorphism, expression in Escherichia coli.
Biochemistry **27**, 752-759.
- Blinder MA, Tollefsen DM (1990)
Site-directed mutagenesis of arginine 103 and lysine 185 in the proposed glycosaminoglycan-binding site of heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **265**, 286-291.
- Bock PE, Olson ST, Björk I (1997)
Inactivation of thrombin by antithrombin is accompanied by inactivation of regulatory exosite I.
J. Biol. Chem. **272**, 19837-19845.

- Bock SC, Wion KL, Vehar GA, Lawn RM (1982)
Cloning and expression of the cDNA for human antithrombin III.
Nucleic Acids Res. **10**, 8113-8125.
- Bode W, Huber R (1992)
Natural proteinase inhibitors and their interaction with proteinases.
Eur. J. Biochem **204**, 433-451.
- Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J (1989)
The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment.
EMBO J. **8**, 3467-3475.
- Bode W, Turk D, Karshikov A (1992)
The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships.
Protein Sci. **1**, 426-471.
- Boer HC de, Groot PG de, Bouma BN, Preissner KT (1993)
Ternary vitronectin-thrombin-antithrombin III complexes in human plasma.
J. Biol. Chem. **268**, 1279-1283.
- Böhme C, Nitz M, Grabenhorst E, Conradt HS, Strathmann A, Ragg H (2002)
Tyrosine sulfation and N-glycosylation of human heparin cofactor II from plasma and recombinant chinese hamster ovary cells and their effects on heparin binding.
European Journal of Biochemistry **296**, 977-988
- Brennan SO, George PM, Jordan RE (1987)
Physiological variant of antithrombin-III lacks carbohydrate sidechain at Asn 135.
FEBS Letters **219**, 431-436.
- Briginshaw GF, Shanberge JN (1974)
Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma.
Arch. Biochem. Biophys. **161**, 683-690.
- Brinkman-van der Linden ECM, De Haan PF, Havenaar EC, Van Dijk W (1998)
Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X is not restricted to alpha1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on alpha1-antichymotrypsin and haptoglobin.
Glycoconjugate J. **15**, 177-182.
- Bruce D, Perry DJ, Borg JY, Carrell RW, Wardell MR (1994)
Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (187 Asn-Asp).
J. Clin. Invest. **94**, 2265-2274.
- Bruch M, Weiss V, Engel J (1988)
Plasma serine proteinase inhibitors (serpins) exhibit major conformational changes and a large increase in conformational stability upon cleavage at their reactive sites.
J. Biol. Chem. **263**, 16626-16630.
- Bülles J, Barzik H, Klosson RJ, Schickle HP, Gronau S (1990)
SensiQuant-Färbung. Eine hochempfindliche, quantifizierbare und automatisierbare Coomassie-Färbung von SDS-Elektrophorese-Gelen in der Proteinurier-Diagnostik mit Hilfe von PhastSystem.
A49 6/90, Pharmacia LKB Biotechnologie
- Bundgaard JR, Vuust J, Rehfeld JF (1997)
New consensus features for tyrosine O-sulfation determined by mutational analysis.
J. Biol. Chem. **272**, 21700-21705

- Büntemeyer H, Lütkemeyer D, Lehmann J (1991)
Optimization of serum-free fermentation processes for antibody production.
Cytotechnology **5**, 57-67.
- Büntemeyer H (2000)
Off-line analysis in animal cell culture, methods.
in: *Encyclopedia of cell technology*, Spier RE, Griffith B, Scragg AH (Ed.), Wiley, New York
- Burgess JW, Gould DR, Marcel YL (1998)
The HepG2 extracellular matrix contains separate heparinase- and lipid-releasable pools of ApoE.
J. Biol. Chem. **273**, 5645-5654.
- Capel PJA (1975)
The defined antigen substrate spheres (DASS) system and some of its applications.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **254**, 108-118.
- Carlström AS, Lieden K, Björk I (1977)
Decreased binding of heparin to antithrombin following the interaction between antithrombin and thrombin.
Thromb. Res. **11**, 785-797.
- Carrell R, Skinner R, Wardell M, Whisstock J (1995)
Antithrombin and heparin.
Molecular Medicine Today **1**, 226-231.
- Carrell RW, Evans DL, Stein PE (1991)
Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis.
Nature **353**, 576-578.
- Carrell RW, Lomas DA (1997)
Conformational disease.
Lancet **350**, 134-138.
- Chaney WG, Howard DR, Pollard JW, Sallustio S, Stanley P (1986)
High-frequency transfection of CHO cells using polybrene.
Somatic Cell Mol. Genet. **12**(3), 237-244.
- Chang JY (1983)
The functional domain of hirudin, a thrombin-specific inhibitor.
FEBS Letters **164**, 307-313.
- Chitolie A, Mackie IJ, Machin SJ, Porter JB (1996)
Heparin Cofactor II is depleted from plasma after incubation with normal, sickle, and thalassaemia red cells.
British J. of Haematology **93**, 88.
- Choudhary G, Horvath C (1996)
Ion-exchange chromatography.
Methods in Enzymology **270**, 47-82.
- Church FC, Noyes CM, Griffith MJ (1985)
Inhibition of chymotrypsin by heparin cofactor II.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 6431-6434.
- Church FC, Meade JB, Pratt CW (1987)
Structure-function relationships in heparin cofactor II: spectral analysis of aromatic residues and absence of a role for sulfhydryl groups in thrombin inhibition.
Arch. Biochem. Biophys. **259**, 331-340.
- Church FC, Meade JB, Treanor RE, Whinna HC (1989)
Antithrombin activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III and thrombin.
J. Biol. Chem. **264**, 3618-3623.

- Church FC, Pratt CW, Hoffman M (1991)
Leukocyte chemoattractant peptides from the serpin heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **266**, 704-709.
- Church FC, Pratt CW, Treanor RE, Whinna HC (1988)
Antithrombin action of phosphitin and other phosphate-containing polyanions is mediated by heparin cofactor II.
FEBS Letters **237**, 26-30.
- Ciaccia AV, Cunningham EL, Church FC (1995)
Characterization of recombinant heparin cofactor II expressed in insect cells.
Protein expression and purification **6**, 806-812.
- Ciaccia AV, Monroe DM, Church FC (1997a)
Arginine 200 of heparin cofactor II promotes intramolecular interactions of the acidic domain. Implication for thrombin binding.
J. Biol. Chem. **272**, 14074-14079.
- Ciaccia AV, Willemze AJ, Church FC (1997b)
Heparin promotes proteolytic inactivation by thrombin of a reactive site mutant (L444R) of recombinant heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **272**, 888-893.
- Cockwell P, Adams DH, Savage COS, (1996)
Glycosaminoglycans contribute to multiple functions of vascular endothelial cells.
Clinical and Experimental Immunology **104**, 1-3.
- Cohn EJ, Hughes JR, Weare JH (1947)
Preparation and properties of serum and plasma proteins. 13: Crystallization of serum albumins from ethanol-water mixtures.
J. Am. Chem. Soc. **69**, 1753-1757.
- Colucci M, Sardella L, Barbanti M, Calanni F, Semeraro N (1997)
Thrombolysis enhancing activity of a low molecular weight dermatan sulfate (desmin 370) in experimental pulmonary embolism in rats.
Thomb. Res. **87**, 441-446.
- Colwell NS, Grupe MJ, Tollefsen DM (1999)
Amino acid residues of heparin cofactor II required for stimulation of thrombin inhibition by sulphated polyanions.
Biochim. Biophys. Acta **1431**, 148-156.
- Colwell NS, Tollefsen DM (1998)
Isolation of frog and chicken cDNAs encoding heparin cofactor II.
Thromb. Haemost. **80**, 784-790.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941)
Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.
Proc. Soc. Exp. Biol. **47**, 200-202.
- Crisp RJ, Knauer DJ, Knauer MF (2000)
Roles of the heparin and low density lipid receptor-related protein-binding sites of protease nexin 1 (PN1) in urokinase-PN1 complex catabolism. The PN1 heparin-binding site mediates complex retention and degradation but not cell surface binding or internalization.
J. Biol. Chem. **275**, 19628-19637
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, and Iozzo RV (1997)
Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility.
J. Cell Biol. **136**, 729-743.

- Darlington GJ (1987)
Liver cell lines.
Methods in Enzymology **151**, 19-38.
- Davis RL, Shrimpton AE, Holohan PD, Bradshaw C, Feiglin D, Collins GH, Sonderegger P, Kinter J, Becker LM, Lacbawan F, Krasnewich D, Muenke M, Lawrence DA, Yerby MS, Shaw CM, Gooptu B, Elliott PR, Finch JT, Carrell RW, Lomas DA (1999)
Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin.
Nature **401**, 376-379.
- Dawes J, Zammit A (1995)
Fibrinogen inhibits the heparin cofactor II-mediated antithrombin activity of dermatan sulfate.
Blood **85**, 720-726.
- Deacon SL, Howell RM (1976)
Physical studies on calcium phosphate and barium citrate used as clotting-factor adsorbents.
Biochem. Soc. Transactions **4**, 720-723
- De Bernadez Clark E (1998)
Refolding of recombinant proteins.
Curr. Opinion Biotech. **9**, 157-163.
- De Boer HC, Preissner KT, Bouma, BN, Groot PG de (1995)
Internalization of vitronectin-thrombin-antithrombin complex by endothelial cells leads to deposition of the complex into the subendothelial matrix.
J. Biol. Chem. **270**, 30733-30740.
- Delorme MA, Xu L, Berry L, Mitchell L, Andrew M (1998)
Anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan (decorin) in the human placenta.
Thromb. Res. **90**, 147-153.
- Derechin VM, Blinder MA, Tollefsen DM (1990)
Substitution of arginine for Leu444 in the reactive site of heparin cofactor II enhances the rate of thrombin inhibition.
J. Biol. Chem. **265**, 5623-5628.
- Desai UR, Petitou M, Bjork I, Olson ST (1998)
Mechanism of heparin activation of antithrombin. Role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin.
J. Biol. Chem. **273**, 7478-7487.
- Di Carlo V, Agnelli G, Prandoni P, Coccheri S, Gensini GF, Gianese F, Mannucci PM, (1999)
Dermatan sulphate for the prevention of postoperative venous thromboembolism in patients with cancer.
Thrombosis and Haemostasis **82**, 30-34.
- Ding Z, Xu Y (1995)
A rapid simplified purification of bovine thrombin.
Preparative Biochemistry **25**, 21-28.
- Duksin D, Mahoney WC (1982)
Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin.
J. Biol. Chem. **257**, 3105-3109.
- Duvar S (1992)
Microcarrier-Kultivierung primärer Endothelzellen aus der Rinderaorta in Spinnerflaschen und im Bioreaktor.
Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

- Duvar S (1996)
Isolierung und strukturelle Charakterisierung der Glykosphingolipide von Endothelzellen aus Microcarrier-Bioreaktorkulturen.
Dissertation, Universität Bielefeld.
- Eagle H (1959)
Amino acid metabolism in mammalian cell culture.
Science **130**, 432-437.
- Eckert R (1999)
Untersuchungen zu post-translationalen Modifikationen von Heparinkofaktor II.
Diplomarbeit, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld.
- Edmunds T, Paten van SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson JM, Cole ES (1998)
Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin.
Blood **91**, 4561-4571.
- Ehler E, Babiychuk E, Draeger A (1996)
Human foetal lung (IMR-90) cells: myofibroblasts with smooth muscle-like contractile properties.
Cell motility and the cytoskeleton **34**, 288-298.
- Elbein AD (1987)
Glycosylation inhibitors for N-linked glycoproteins.
Methods in Enzymology **138**, 661-709.
- Ersdal-Badju E, Lu A, Zuo Y, Picard V, Bock SC (1997)
Identification of the antithrombin III heparin binding site.
J. Biol. Chem. **272**, 19393-19400.
- Essex DW, Miller A, Swiatkowska M, Feinman RD (1999)
Protein disulfid isomerase catalyzes the formation of disulfide-linked complexes of vitronectin with thrombin-antithrombin.
Biochemistry **38**, 10398-10405
- Fa M, Bergstrom F, Hagglof P, Wilczynska M, Johansson LB, Ny T (2000)
The structure of a serpin-protease complex revealed by intramolecular distance measurements using donor-donor energy migration and mapping of interaction sites.
Structure Fold. Des. **8**, 397-405.
- Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Linhardt RJ, Rees DC (1996)
Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor.
Science **271**, 1116-1120.
- Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld (1997)
Praktikums-Skript, Biochemie, Versuch: IgG-Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markierten Immunkomplexen.
- Fan B, Crews BC, Turko IV, Choay J, Zettlmeißl, Gettins P (1993)
Heterogeneity of recombinant human antithrombin III expressed in baby hamster kidney cells.
J. Biol. Chem. **268**, 17588-17598.
- Farooqui AA (1980)
Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography.
J. Chromatography **184**, 335-345.
- Fish WW, Danielsson A, Nordling K, Miller SH, Lam CF, Bjork I (1985)
Denaturation behavior of antithrombin in guanidinium chloride. Irreversibility of unfolding caused by aggregation.
Biochemistry **24**, 1510-1517.

- Fish WW, Orre K, Björk I (1979)
The production of an inactive form of antithrombin through limited proteolysis by thrombin
FEBS Letters **98**, 103-106
- Flesher AR, Marzowski J, Wang WC, Raff HV (1995)
Fluorophore labeled glycan analysis of immunoglobulin fusion proteins: correlation of oligosaccharide content with in vivo clearance profile.
Biotechnology and Bioengineering **46**, 399-407.
- Franzen LE, Svensson S (1980)
Structural studies on the carbohydrate portion of human antithrombin III.
J. Biol. Chem. **255**, 5090-5093
- Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI (1997)
Evidence for allosteric linkage between exosites 1 and 2 of thrombin.
J. Biol. Chem. **272**, 25493-25499.
- Fridman R, Alon Y, Doljanski F, Fuks Z, Vlodavsky I (1985)
Cell interaction with the extracellular matrices produced by endothelial cells and fibroblasts.
Experim. Cell Research **158**, 461-476.
- Fromm JR, Hileman RE, Caldwell EEO, Weiler JM, Linhardt RJ (1995)
Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor.
Arch. Biochem. Biophys. **323**, 279-287.
- Gabay C, Kushner I (1999)
Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.
N. Engl. J. Med. **340**, 448-454
- Garone L, Edmunds T, Hanson E, Bernasconi R, Huntington JA, Meagher JL, Fan B, Gettins PGW (1996)
Antithrombin-heparin affinity reduced by fucosylation of carbohydrate at asparagine 155.
Biochemistry **35**, 8881-8889.
- Gebauer KH, Thömmes J, Kula MR (1997)
Plasma protein fractionation with advanced membrane adsorbents.
Biotech. Bioeng. **54**, 181-189.
- Geiger M, Krebs M, Jerabek I, Binder BR (1997)
Protein C inhibitor (PCI) and heparin cofactor II (HCII): possible alternative roles of these heparin-binding serpins outside the hemostatic system.
Immunopharmacology **36**, 279-284.
- Gettins PGW, Patston PA, Olson ST (1996)
Serpins: structure, function and biology.
Springer-Verlag, Heidelberg .
- Goldsack NR, Chambers RC, Dabbagh K, Laurent GJ (1998)
Molecules in focus: Thrombin.
Int. J. Biochem. Cell Biol. **30**, 641-646.
- Gomes B, Dietrich CP (1982)
Distribution of heparin and other sulfated glycosaminoglycans in vertebrates.
Comp. Biochem. Physiol. **73B**, 857-863.
- Gooptu B, Hazes B, Chang WS, Dafforn TR, Carrell RW, Read RJ, Lomas DA (2000)
Inactive conformation of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: implications for inhibitory function and conformational disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**, 67-72.

- Görg A, Postel W, Gunther S (1988)
The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.
Electrophoresis. **9**, 531-546.
- Gospodarowicz D, Delgado D, Vlodavsky I (1980)
Permissive effect of the extracellular matrix on the cell proliferation in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 4094-4098.
- Grabenhorst E, Nimtz M, Costa J, Conradt HS (1998)
In Vivo Specificity of Human 1,3/4-Fucosyltransferases III-VII in the Biosynthesis of LewisX and Sialyl LewisX Motifs on Complex-type N-Glycans.
J. Biol. Chem. **273**, 30985-30994
- Grabenhorst E, Schlenke P, Pohl S, Nimtz M, Conradt HS (1999)
Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells.
Glycoconjugate J. **16**, 81-97.
- Griffith MJ, Carraway T, White GC, Dombrose FA (1983)
Heparin cofactor activities in a family with hereditary antithrombin III deficiency: evidence for a second heparin cofactor in human plasma.
Blood **61**, 111-118.
- Griffith MJ, Noyes CM, Church FC (1985)
Reactive site peptide structural similarity between heparin cofactor II and antithrombin III.
J. Biol. Chem. **260**, 2218-2225.
- Grodberg J, Dunn JJ (1988)
ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification.
J. Bacteriol. **170**, 1245-1253.
- Grootenhuys PD, Westerduin P, Meuleman D, Petitou M, van Boeckel CA (1995)
Rational design of synthetic heparin analogues with tailor-made coagulation factor inhibitory activity.
Nature Structural Biology **2**, 736-739.
- Guex N, Peitsch MC (1997)
SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling.
Electrophoresis **18**, 2714-2723.
- Han JH, Tollefsen DM (1998)
Ligand binding to thrombin exosite II induces dissociation of the thrombin-heparin cofactor II(L444R) complex.
Biochemistry **37**, 3203-3209.
- Han JH, Van Deerlin VMD, Tollefsen DM (1997)
Heparin facilitates dissociation of complexes between thrombin and a reactive site mutant (L444R) of heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **272**, 8243-8249.
- Hao YL, Ingham KC, Wickerhauser M (1980)
Fractional precipitation of proteins with polyethylene glycol.
in: Methods of plasma fractionation, Curling (Ed.), Academic Press, 57-74.
- Hatton MW, Ross B, Southward SM, Dereske M, Hoogendoorn H, Blajchman MA, Richardson M (1999)
Uptake of heparin cofactor II and antithrombin into the aorta wall after a deendothelializing injury in vivo: comparison with the behaviors of prothrombin and fibrinogen.
J. Lab. Clin. Med. **133**, 81-87.
- Hatton MWC, Hoogendoorn H, Southward SMR, Ross B, Blajchman MA (1997)
Comparative metabolism and distribution of rabbit heparin cofactor II and rabbit antithrombin in rabbits.
Am. J. Physiol. **272**, E824-E831.

- Hayakawa Y, Hayashi T, Hayashi K, Hayashi T, Ozawa T, Niiya K, Sakuragawa N (1996)
Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan.
Blood Coagul. & Fibrinolysis **7**, 554-560.
- Hayakawa Y, Hayashi T, Lee JB, Ozawa T, Sakuragawa N (2000)
Activation of heparin cofactor II by calcium spirulan.
J. Biol. Chem. **275**, 11379-11382.
- Hayashi T, Hayakawa Y, Hayashi T, Sasaki H, Sakuragawa N (1997)
Sulfated polysaccharide from the leaves of Artemisia Princeps activates heparin cofactor II independently of the Lys 173 and Arg 189 residues of heparin cofactor II.
Thomb. Res. **87**, 105-112.
- He XM, Carter DC (1992)
Atomic structure and chemistry of human serum albumin.
Nature **358**, 209-215
- Heidemann R (1995)
Bestimmung und Anwendung zellspezifischer Parameter für die Kultivierung tierischer Zellen in Bioreaktoren. Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Heidemann R, Riese U, Lütkemeyer D, Büntemeyer H, Lehmann J (1994)
The Super-Spinner: A low cost animal cell culture bioreactor for the CO₂-incubator .
Cytotechnology **14**, 1-9.
- Hellweg E (2000)
Untersuchungen zur Expression des Heparinkofaktor II-Gens in HepG2-Zellen unter dem Einfluß externer Faktoren.
Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld
- Hermentin P, Witzel R, Kanzy EJ, Diderrich G, Hoffmann D, Metzner H, Vorlop J, Haupt H (1996)
The hypothetical N-glycan charge: a number that characterizes protein glycosylation.
Glycobiology **6**, 217-230.
- Herzog RH, Lutz S, Blin N, Marasa JC, Blinder MA, Tollefsen DM (1991)
Complete nucleotide sequence of the gene for human heparin cofactor II and mapping to chromosomal band 22q11.
Biochemistry **30**, 1350-1357.
- High S, Lecomte FJ, Russell SJ, Abell BM, Oliver JD (2000)
Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones?
FEBS Letters **476**, 38-41
- Hileman RE, Fromm JR, Weiler JM, Linhardt RJ (1998)
Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins.
Bioessays **20**, 156-167.
- Hindmash EJ, Marks RM (1998)
Complement activation occurs on subendothelial extracellular matrix in vitro and is initiated by retraction or removal of overlying endothelial cells.
J. Immunology **160**, 6128-6136.
- Hiramoto SA, Cunningham DD (1988)
Effects of fibroblasts and endothelial cells on inactivation of target proteases by protease nexin-I, heparin cofactor II, and C1-inhibitor.
J. Cellular Biochemistry **36**, 199-207.

- Hoffmann A, Nimtz M, Getzlaff R, Conradt HS (1995)
Brain-type N-glycosylation of asialo-transferrin from human cerebrospinal fluid.
FEBS Letters **359**, 164-168.
- Hofmeister F (1892)
Über die Darstellung von krystallisiertem Eialbumin und die Krystallisierbarkeit colloider Stoffe.
Z. Physiol. Chem. **14**, 165-172.
- Hogg PJ, Jackson CM, Labanowsky JK, Bock PE (1996)
Binding of fibrin monomer and heparin to thrombin in a ternary complex alters the environment of the thrombin catalytic site, reduces affinity for hirudin, and inhibits cleavage of fibrinogen.
J. Biol. Chem. **271**, 26088-26095.
- Hölper J (1991)
Diplomarbeit bei der Hoechst AG: Entwicklung und Automatisierung eines ELISA zum quantitativen Nachweis von Heparin Cofaktor II in Körperflüssigkeiten.
Fachhochschule Giessen-Friedberg.
- Höök M, Björk I, Hopwood J, Lindahl U (1976)
Anticoagulant activity of heparin: separation of high-affinity and low-affinity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin.
FEBS Letters **66**, 90-93.
- Hortin GL, Farries TC, Graham JP, Atkinson JP (1989)
Sulfation of tyrosine residues increases activity of the fourth component of complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **86**, 1338-1342
- Hortin G, Tollefsen DM, Strauss AW (1986)
Identification of two sites of sulfation of human heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **261**, 15827-15830.
- Hortin GL, Trimpe BL (1991)
Allosteric changes in thrombin's activity produced by peptides corresponding to segments of natural inhibitors and substrates.
J. Biol. Chem. **266**, 6866-6871.
- Huntington JA, McCoy A, Belzar KJ, Pei XY, Gettins PG, Carrell RW (2000a)
The conformational activation of antithrombin. A 2.85-Å structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions.
J. Biol. Chem. **275**, 15377-15383.
- Huntington, Read, Carrell (2000b)
Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation.
Nature **407**, 923-926.
- Huttner WB (1982)
Sulphation of tyrosine residues - a widespread modification of proteins.
Nature **299**, 273-276.
- Huttner WB (1987)
Protein tyrosine sulfation.
TIBS **12**, 361-363.
- Ingham KC (1990)
Precipitation of proteins with polyethylene glycol.
Methods in Enzymology **182**, 301-306.
- Iozzo RV (1998)
Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.
Annu. Rev. Biochem. **67**, 609-652.

- Iozzo RV (1999)
The biology of the small leucine-rich proteoglycans.
J. Biol. Chem. **274**, 18843-18846.
- Jaffe EA, Armellino D, Tollefsen DM (1985)
Biosynthesis of functionally active heparin cofactor II by a human hepatoma-derived cell line.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **132**, 368-374.
- Jäger V, Lehmann J, Friedl P (1988)
Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors.
Cytotechnology **1**, 319-329
- Janciauskiene S, Wright HT (1998)
Inflammation, antichymotrypsin, and lipid metabolism: autogenic etiology of Alzheimer's disease.
Bioessays **20**, 1039-1046.
- Janson JC, Ryden L (1996)
Protein purification: principles, high resolution methods, and applications.
2. Aufl., Wiley, New-York.
- Jenkins N (1996)
Role of physiology in the determination of protein heterogeneity.
Current Opinion in Biotechnology **7**, 205-209.
- Jordan R, Beeler D, Rosenberg R (1979)
Fractionation of low molecular weight heparin species and their interaction with antithrombin.
J. Biol. Chem. **254**, 2902-2913.
- Joslin G, Wittwer A, Adams S, Tollefsen DM, August A, Perlmutter DH (1993)
Cross-competition for binding of alpha 1-antitrypsin (alpha 1 AT)-elastase complexes to the serpin-enzyme complex receptor by other serpin-enzyme complexes and by proteolytically modified alpha 1 AT.
J. Biol. Chem. **268**, 1886-1893.
- Kaji T, Ejiri N, Hayakawa Y, Hayashi T, Sakuragawa N (1990)
Heparin cofactor II inhibits thrombin-stimulated release of tissue plasminogen activator from cultured human endothelial cells in the presence of dermatan sulfate.
Thromb. Res. **59**, 269-277.
- Kaji T, Itoh F, Hayakawa Y, Oguma Y, Sakuragawa N (1989)
Interaction of thrombin with heparin cofactor II and antithrombin III on prostacyclin production by cultured endothelial cells.
Thromb. Res. **56**, 99-107.
- Kamp PB, Ragg H (1999)
Rapid changes in the exon/intron structure of a mammalian thrombin inhibitor gene.
Gene **229**, 137-144.
- Kapuscinski J (1990)
Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes.
J. Histochem. Cytochem. **38**, 1323-1329
- Kaufman RJ, Sharp PA (1982)
Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene.
J. Mol. Biol. **159**, 601-621.
- Kempken R (1992)
Entwicklung eines Systems zur Mediumrezyklisierung und Lactatentfernung für die kontinuierliche Fermentation tierischer Zellen.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld

- Kehoe JW, Bertozzi CR (2000)
Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions.
Chem. Biol. **7**, R57-61.
- Keown WA, Campbell CR, RS Kucherlapati (1990)
Methods for introducing DNA into mammalian cells.
Methods in Enzymology **185**, 527-537.
- Kim YS, Lee KB, Linhardt RJ (1988)
Microheterogeneity of plasma glycoproteins heparin cofactor II and antithrombin III and their carbohydrates analysis.
Thromb. Res. **51**, 97-104.
- Kinsella MG, Tsoi CK, Järveläinen HT, Wight TN (1997)
Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells.
J. Biol. Chem. **272**, 318-325.
- Kinsella MG, Wight TN (1986)
Modulation of sulfated proteoglycan synthesis by bovine aortic endothelial cells during migration.
J. Cell Biol. **102**, 679-687.
- Klein NJ, Shennan GI, Heyderman RS, Levin M (1992)
Alteration in glycosaminoglycan metabolism and surface charge on human umbilical vein endothelial cells induced by cytokines and neutrophils.
J. Cell Science **102**, 821-832.
- Koike C, Hayakawa Y, Niiya, K, Sakuragawa N, Sasaki H (1996)
The production of heparin cofactor II is not regulated by inflammatory cytokines in human hepatoma cells: comparison with plasminogen activator inhibitor type-1.
Thromb. Haemost. **75**, 298-302.
- Kounnas MZ, Church FC, Argraves WS, Strickland DK (1996)
Cellular internalization degradation of antithrombin III: thrombin, heparin cofactor II:thrombin, and alpha1antitrypsin:trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein.
J. Biol. Chem. **271**, 6523-6529.
- Krepulat F (1999)
Untersuchungen zur Expression von Heparinkofaktor II & Varianten mit Immun-Tags in Escherichia coli.
Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Krüger O (1998)
Untersuchungen zur N- und O-Glykosylierung des Heparin Cofaktor II.
Blockpraktikums-Protokoll, AG Zelluläre Genetik.
- Kubista M, Akerman B, Norden B (1987)
Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy.
Biochemistry **26**, 4545-4553
- Laemmli UK (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage.
Nature **227**, 680-685.
- Lasky LA (1992)
Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation.
Science **258**, 964-969.
- Lawrence DA, Ginsburg D, Day DE, Berkenpas MB, Verhamme IM, Kvassman JO, Shore JD (1995)
Serpine-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates.
J. Biol. Chem. **270**, 25309-25312.

- Lawrence DA, Olson ST, Muhammad S, Day DE, Kvassman JO, Ginsburg D, Shore JD (2000)
Partitioning of serpin-protease reactions between stable inhibition and substrate cleavage is regulated by the rate of serpin reactive center loop insertion into beta-sheet A.
J. Biol. Chem. **275**, 5839-5844.
- Lee C, Park SH, Lee MY, Yu MH (2000)
Regulation of protein function by native metastability.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**, 7727-7731.
- Lehmann J, Heidemann, R, Riese U, Lütkemeyer D, Büntemeyer H (1992)
Der Superspinner - Ein „Brutschrank-Fermenter“ für die Massenkultur tierischer Zellen.
BioEngineering **5/6**, 36-38.
- Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, Huttner WB, Verbeet MP, Mertens K, van Mourik JA (1991)
Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor.
J. Biol. Chem. **266**, 740-746
- Li F, Wilkins PP, Crawley S, Weinstein J, Cummings RD, McEver RP (1996)
Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin.
J. Biol. Chem. **271**, 3255-3264.
- Liaw PCY, Austin RC, Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI (1999)
Comparison of heparin- and dermatansulfate-mediated catalysis of thrombin inactivation by heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **274**, 27597-27604.
- Lidholt K (1997)
Biosynthesis of glycosaminoglycans in mammalian and in bacteria.
Biochemical Society Transactions **25**, 866-870.
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G (1976)
A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.
Int. J. Cancer **17**, 62-70.
- Lindhahl U, Kusche-Gullberg M, Kjellen L (1998)
Regulated diversity of heparan sulfate.
J. Biol. Chem. **273**, 249797-24982
- Lindhahl U, Thunberg L, Backstrom G, Riesenfeld J, Nordling K, Bjork I (1984)
Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin.
J. Biol. Chem. **259**, 12368-12376.
- Lindl T, Bauer J (1994)
Zell- und Gewebekultur.
3. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Linhardt RJ, Hileman RE (1995)
Dermatan sulfate as a potential therapeutic agent.
General Pharmacology **26**, 443-451.
- Liu L, Dewar L, Song Y, Kulczycky M, Blajchman MA, Fenton JW, Andrew M, Delorme M, Ginsberg J, Preissner KT, Ofosu FA (1995)
Inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II in vivo.
Thromb. Haemost. **73**, 405-412.
- Liu T, Pemberton PA, Robertson AD (1999)
Three-state unfolding and self-association of maspin, a tumor-suppressing serpin.
J. Biol. Chem. **274**, 29628-29632.

- Loebermann H, Tokuoka R, Deisenhofer J, Huber R (1984)
Human alpha1-proteinase-inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function.
J. Mol. Biol. **177**, 531-556.
- Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW (1992)
The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver.
Nature **357**, 605-607.
- Longin A, Souchier C, Ffrench M, Bryon PA (1993)
Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study.
J. Histochem. Cytochem. **41**, 1833-1840.
- Lottspeich F, Zorbas H (1998)
Bioanalytik.
1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Maaroufi RM, Jozefowicz M, Tapon-Bretonnière J, Fischer AM (1997)
Mechanism of thrombin inhibition by antithrombin and heparin cofactor II in the presence of heparin.
Biomaterials **18**, 203-211.
- Maaroufi RM, Jozefowicz M, Tapon-Bretonnière J, Jozefonvicz J, Fischer AM (1997)
Mechanism of thrombin inhibition by heparin cofactor II in the presence of dermatan sulphates, native or oversulphated, and a heparin-like dextran derivative.
Biomaterials **18**, 359-366.
- Mackie IJ, Segal H, Burren T, Gallimore M, Walshe KJ, Robinson G, Machin SJ (1990)
Heparin cofactor II levels are increased by the use of combined oral contraceptives.
Blood Coagulation and Fibrinolysis **1**, 647-651.
- Maekawa H, Sato H, Tollefsen DM (2000)
Thrombin inhibition by HCII in the presence of elastase-cleaved HCII and Thrombin-HCII complex.
Thromb. Res. **100**, 443-451.
- Maekawa H, Tollefsen DM (1996)
Role of the proposed serpin-enzyme complex receptor recognition site in binding and internalization of thrombin-heparin cofactor II complexes by hepatocytes. .
J. Biol. Chem. **271**, 18604-18609.
- Mai S, Chung AE (1984)
Cell attachment and spreading on extracellular matrix-coated beads.
Exp. Cell Res. **152**, 500-509.
- Maimone MM, Tollefsen DM (1990)
Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity.
J. Biol. Chem. **265**, 18263-18271.
- Marquardt F (1994)
The development of hirudin as antithrombotic drug.
Thromb. Res. **74**, 1-23.
- Massouh M, Jatou A, Gordon EM, Ratnoff OD (1989)
Heparin cofactor II activity in plasma during pregnancy and oral contraceptive use.
J. Lab. Clin. Med. **114**, 697-699.
- McGuire EA, Tollefsen DM (1987)
Activation of heparin cofactor II by fibroblasts and vascular smooth muscle cells.
J. Biol. Chem. **262**, 169-175.

- Mellet P, Bieth JG (2000)
Evidence that translocation of the proteinase precedes its acylation in the serpin inhibition pathway.
J. Biol. Chem. **275**, 10788-10795.
- Miksch G, Neitzel R, Fiedler E, Friehs K, Flaschel E (1997)
Extracellular production of a hybrid beta-glucanase from bacillus by escherichia coli under different cultivation conditions in shaking cultures and bioreactors.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**, 120-126
- Mikkelsen J, Thomsen J, Ezban M (1991)
Heterogeneity in the tyrosine sulfation of chinese hamster ovary cell produced recombinant FVIII.
Biochemistry **30**, 1533-1537.
- Molecular Probes, Product Information (1999)
DAPI nucleic acid stain.
- Murch SH, MacDonald TT, Walker-Smith JA, Levin M, Lionetti P, Klein NJ (1993)
Disruption of sulfated glycosaminoglycans in intestinal inflammation.
The Lancet **341**, 711-714.
- Müthing J, Duvar S, Nerger S, Büntemeyer H, Lehmann J (1996)
Microcarrier cultivation of bovine aortic endothelial cells in spinner vessels and a membrane stirred bioreactor.
Cytotechnology **18**, 193-206.
- Myles T, Church FC, Whinna HC, Monard D, Stone SR (1998)
Role of thrombin anion-binding exosite-I in the formation of thrombin-serpin complexes.
J. Biol. Chem. **273**, 31203-31208.
- Ngo TT (1988)
Nonisotopic immunoassays.
Plenum Press, New York u.a.
- Ni H, Blajchman MA, Ananthanarayanan VS, Smith IJ, Sheffield WP (2000)
Mutation of any site of N-linked glycosylation accelerates the in vivo clearance of recombinant rabbit anti-thrombin.
Thromb. Res. **99**, 407-415.
- Nichols WW, Murphy DG, Cristofalo VJ, Toji LH, Greene AE, Dwight SA (1976)
Characterization of a new human diploid cell strain. IMR-90.
Science **196**, 60-63.
- Niehhs C, Beisswanger R, Huttner WB (1994)
Protein tyrosine sulfation, 1993 - an update.
Chem. Biol. Interact. **92**, 257-271.
- Novagen (1997)
pET System Manual.
7th Ed.
- Novex (1997)
Precast Gel Instructions.
- O'Farrell PH (1975)
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
J. Biol. Chem **250**, 4007-4021.
- Olson ST, Björk I (1991)
Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the anti-thrombin-thrombin reaction.
J. Biol. Chem. **266**, 6353-6364.

- Olson ST, Frances-Chmura AM, Swanson R, Bjork I, Zettlmeissl G (1997)
Effect of individual carbohydrate chains of recombinant antithrombin on heparin affinity and on the generation of glycoforms differing in heparin affinity.
Arch. Biochem. Biophys. **341**, 212-221.
- Olson ST, Halvorson HR, Björk I (1991)
Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction.
J. Biol. Chem. **266**, 6342-6352.
- Olson ST, Shore JD (1986)
Transient kinetics of heparin-catalyzed protease inactivation by antithrombin III. The reaction step limiting heparin turnover in thrombin neutralization.
J. Biol. Chem. **261**, 13151-13159.
- Olson ST, Bjork I, Sheffer R, Craig PA, Shore JD, Choay J (1992)
Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement.
J. Biol. Chem. **267**, 12528-12538.
- O'Malley KM, Cooperman BS (2001)
Formation of the covalent chymotrypsin-antichymotrypsin complex involves no large-scale movement of the enzyme.
J. Biol. Chem. **276**, 6631-6639
- Oscarsson LG, Pejler G, Lindahl U (1989)
Location of the antithrombin-binding sequence in the heparin chain.
J. Biol. Chem. **264**, 296-304.
- Peitsch MC (1995)
Protein modeling by e-mail. From amino acid sequence to protein structure: A free one-hour service.
Bio/Technology **13**, 658-660.
- Perlmutter DH, Glover GI, Rivetna M, Schasteen CS, Fallon RJ (1990)
Identification of a serpin-enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**, 3753-3757.
- Perrimon N, Bernfield M (2000)
Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes.
Nature **404**, 725-728
- Peterson CB, Blackburn MN (1985)
Isolation and characterization of an antithrombin III variant with reduced carbohydrate content and enhanced heparin binding.
J. Biol. Chem. **260**, 610-615.
- Petitou M, Lormeau JC, Perly B, Berthault P, Bossennec V, Sie P, Choay J (1988)
Is there a unique sequence in heparin for interaction with heparin cofactor II? Structural and biological studies of heparin-derived oligosaccharides.
J. Biol. Chem. **263**, 8685-8690.
- Petzelbauer E, Seiffert D, Beckmann R, Pusch B, Geiger M, Binder BR (1992)
Modulation of heparin cofactor II activity by glycosaminoglycans and adhesive glycoproteins.
Thromb. Res. **66**, 559-567.
- Phillips JE, Shirk RA, Whinna HC, Henriksen RA, Church FC (1993)
Inhibition of dysthrombins quick I and II by heparin cofactor II and antithrombin.
J. Biol. Chem. **268**, 3321-3327.

- Picard V, Ersdal-Badju E, Bock SC (1995)
Partial glycosylation of antithrombin III asparagine-135 is caused by serine in the third position of its N-glycosylation consensus sequence and is responsible for production of the beta-antithrombin III isoform with enhanced heparin affinity.
Biochemistry **34**, 8433-8440.
- Picard V, Marque PE, Paolucci F, Aiach M, Le Bonniec BF (1999)
Topology of the stable serpin-protease complexes revealed by an autoantibody that fails to react with the monomeric conformers of antithrombin.
J. Biol. Chem. **274**, 4586-4593.
- Pierce (1993)
Instructions: BCA protein assay reagent.
- Pirt SJ (1985)
Principles of microbe and cell cultivation.
Blackwell Scientific Publications.
- Potempa J, Korzus E, Travis J (1994)
The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation.
J. Biol. Chem. **269**, 15957-15960.
- Praillet C, Lortat-Jacob H, Grimaud JA (1996)
Interferon gamma differently affects the synthesis of chondroitin/dermatan sulphate and heparan sulphate by human skin fibroblasts.
Biochem J. **318**, 863-870.
- Pratt CW, Whinna HC, Meade JB, Treanor RE, Church FC, (1989)
Physicochemical aspects of heparin cofactor II.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **556**, 104-115.
- Pratt CW, Church FC (1992)
Heparin binding to protein C inhibitor.
J. Biol. Chem. **267**, 8789-8794.
- Pratt CW, Tobin RB, Church FC (1990)
Interaction of heparin cofactor II with neutrophil elastase and cathepsin G.
J. Biol. Chem. **265**, 6092-6097.
- Pratt CW, Whinna HC, Church FC (1992)
A comparison of three heparin-binding serine proteinase inhibitors.
J. Biol. Chem. **267**, 8795-8801.
- Preissner KT, Sie P (1988)
Modulation of heparin cofactor II function by S protein (vitronectin) and formation of a ternary S protein-thrombin-heparin cofactor II complex.
Thromb. Haemost. **60**, 399-406.
- Ragg (1986)
A new member of the plasma protease inhibitor gene family.
Nucleic Acids Research **14**, 1073-1088.
- Ragg H, Preibisch G (1988)
Structure and expression of the gene encoding for the human serpin hLS2.
J. Biol. Chem. **263**, 12129-12134.
- Ragg H, Ulshöfer T, Gerewitz J (1990a)
On the activation of human leuserpin-2, a thrombin inhibitor, by glycosaminoglycans.
J. Biol. Chem. **265**, 5211-5218.

- Ragg H, Ulshöfer T, Gerewitz J (1990b)
Glycosaminoglycan-mediated leuserpin-2/thrombin interaction. Structure-function relationships.
J. Biol. Chem. **265**, 22386-22391.
- Ragg H, Lokot T, Kamp PB, Atchley WR, Dress A (2001)
Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses.
Mol. Biol. Evol. **18**, 577-584
- Record MT Jr., Lohman TM, De Haseth P (1976)
Ion effects on ligand-nucleic acid interaction.
J. Mol. Biol. **107**, 145-158.
- Remold-O'Donnell E (1993)
The ovalbumin family of serpin proteins.
FEBS Letters **315**, 105-108.
- Reuter G, Gabius HJ (1999)
Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool.
Cellular and Molecular Life Sciences **55**, 368-422.
- Ringold G, Dieckman B, Lee F (1981)
Coexpression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the Escherichia coli XGPRT gene in chinese hamster ovary cells.
J. Mol. Appl. Genet. **1**, 165-175.
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW (1987)
Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase.
Gene **56**, 125-135.
- Rudolph R, Lilie H (1996)
In vitro folding of inclusion body proteins.
FASEB J. **56**, 49-56.
- Russell WC, Newman C, Williamson DH (1975)
A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses.
Nature **253**, 461-462.
- Sako D, Comess KM, Barone KM, Camphausen RT, Cumming DA, Shaw GD (1995)
A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding.
Cell **83**, 323-331.
- Sandset PM, Andersson TR (1989)
Coagulation inhibitor levels in pneumonia and stroke: changes due to consumption and acute phase reaction.
J. Intern. Med. **225**, 311-316
- Schechter I, Berger A (1967)
On the size of the active site in proteases. I. Papain.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 157-162.
- Schein CH (1989)
Production of soluble recombinant proteins in bacteria.
Bio/Technology **7**, 1141-1148
- Schein CH, Noteborn MHM (1988)
Formation of soluble recombinant proteins in Escherichia coli is favored by lower growth temperature.
Bio/Technology **6**, 291-294.
- Schimke RT (1984)
Gene amplification in cultured animal cells.
Cell **37**, 705-713.

- Schlegel HG (1985)
Allgemeine Mikrobiologie.
6. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Schmidt T (1998)
Produktion und Analytik von Plasmid-DNA für die Gentherapie.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld
- Schmidt U (1997)
Untersuchungen zur Expression von Leuserpin-2-mRNA in menschlichen Geweben.
Diplomarbeit, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld.
- Sheehan JP, Tollefsen DM, Sadler JE (1994)
Heparin Cofactor II is regulated allosterically and not primarily by template effects. Studies with mutant thrombins and glycosaminoglycans.
J. Biol. Chem. **269**, 32747-32751.
- Sheffield WP, Blajchman MA (1995)
Deletion mutagenesis of heparin cofactor II: defining the minimum size of a thrombin inhibiting serpin.
FEBS Letters **365**, 189-192.
- Sheffield WP, Schuyler PD, Blajchman MA (1994)
Molecular cloning and expression of rabbit heparin cofactor II: a plasma thrombin inhibitor highly conserved between species.
Thromb. Haemost. **71**, 778-782.
- Shirk RA, Church FC, Wagner WD (1996)
Arterial smooth muscle cell heparan sulfate proteoglycans accelerate thrombin inhibition by heparin cofactor II.
Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. **16**, 1138-1146.
- Shirk RA, Parthasarathy N, San Antonio JD, Church FC, Wagner WD (2000)
Altered dermatan sulfate structure and reduced heparin cofactor II stimulating activity of biglycan and decorin from human atherosclerotic plaque.
J. Biol. Chem. **275**, 18085-18092
- Shrava-Levine Z, Sokolovsky M (1998)
Functional role for glycosylated subtypes of rat endothelin receptors.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **246**, 495-500.
- Sie P, Dupouy D, Pichon J, Boneu B (1985)
Turnover study of heparin cofactor II in healthy man.
Thromb. Haemost. **54**, 635-638.
- Sinniger V, Tapon-Breaudiere J, Millien C, Muller D, Jozefonvicz J, Fischer AM (1993)
Affinity chromatography of sulphated polysaccharides separately fractionated on antithrombin III and heparin cofactor II immobilized on concanavalin A-Sepharose.
J. Chromatography **615**, 215-223.
- Skinner R, Abrahams JP, Whisstock JC, Lesk AM, Carrell RW, Wardell MR (1997)
The 2.6 Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site.
J. Mol. Biol. **266**, 601-609.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985)
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal. Biochem. **150**, 76-85
- Stein PE, Carrell RW (1995)
What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?.
Structural Biology **2**, 96-113.

- Stein PE, Leslie AG, Finch JT, Carrell RW (1991)
Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution.
J. Mol. Biol. **221**, 941-959.
- Stein PE, Leslie AG, Finch JT, Turnell WG, McLaughlin PJ, Carrell RW (1990)
Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins.
Nature **347**, 99-102.
- Stone SR, Le Bonniec BF (1997)
Inhibitory mechanism of serpins. Identification of steps involving the active-site serine residue of the protease.
J. Mol. Biol. **265**, 344-362.
- Storch WB (1997)
Immunfluoreszenzfibel. Grundlagen und neue Anwendungen in der klinischen Immunologie.
2. Aufl., Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien.
- Stoschek CM (1990)
Quantitation of proteins.
Methods in Enzymology **182**, 50-68.
- Stratikos E, Gettins PGW (1999)
Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**, 4808-4813.
- Streyer L (1990)
Biochemie.
Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg.
- Stubbs MT, Bode W (1995)
The clot thickens: clues provided by thrombin structure.
Trends Biochem. Soc. **20**, 23-28.
- Studier FW, Moffatt BA (1986)
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes..
J. Mol. Biol. **189**, 113-130.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990)
Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.
Methods in Enzymology **185**, 60-89.
- Subramani S, Mulligan R, Berg P (1981)
Expression of the mouse dihydrofolate reductase complementary desoxyribonucleic acid in simian virus 40 vectors.
Mol. Cell Biol. **1**, 854-864.
- Suiko M, Liu MC
Change in binding affinities of 3Y1 secreted fibronectin upon desulfation of tyrosine-O-sulfate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **154**, 1094-1098
- Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, Levine RL
Oxidation of either methionin 351 or methionin 358 in alpha1-antitrypsin causes loss of antineutrophil elastase activity.
J. Biol. Chem. **275**, 27258-27265
- Tanius FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD (1992)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites.
Biochemistry **31**, 3103-3112

- Tarentino AL, Gomez CM, Plummer Jr. TH (1985)
Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F.
Biochemistry **24**, 4665-4671.
- Tarentino AL, Plummer TH (1994)
Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharides-cleaving enzymes from Flavobacterium meningosepticum.
Methods in Enzymology **230**, 44-57.
- Teien AN, Abildgaard U, Hook M (1976)
The anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate.
Thromb. Res. **8**, 859-867.
- Tollefsen DM, Blank MK (1981)
Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.
J. Clin. Invest. **68**, 589-596.
- Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK (1982)
Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.
J. Biol. Chem. **257**, 2162-2169.
- Tollefsen DM, Peacock ME, Monafó WJ (1986)
Molecular size of dermatan sulfate oligosaccharides required to bind and activate heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **261**, 8854-8858.
- Tollefsen DM, Pestka CA (1985)
Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure.
Blood **66**, 169-774.
- Tollefsen DM, Pestka CA (1985)
Modulation of heparin cofactor II activity by histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4.
J. Clin. Invest. **75**, 496-501.
- Tollefsen DM, Pestka CA, Monafó WJ (1983)
Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate.
J. Biol. Chem. **258**, 6713-6716.
- Toschi V, Lettino M, Gallo R, Badimon JJ, Chesebro JH (1996)
Biochemistry and biology of hirudin.
Coronary Artery Disease **7**, 420-428.
- Toulon P, Gandrille S, Remy P, Chadeuf G, Jouvin MH, Aiach M (1992)
Significance of high levels of heparin cofactor II in the plasma and urine of adult patients with nephrotic syndrome.
Nephron **60**, 176-180.
- Toulon P, Lamine M, Ledjev I, Guez T, Holleman ME, Sereni D, Sicard D (1993)
Heparin cofactor II deficiency in patients infected with the human immunodeficiency virus.
Thromb. Haemost. **70**, 730-735.
- Toulon P, Vitoux JF, Fiessinger JN, Sicard D, Aiach M (1991)
Heparin cofactor II: an acute phase reactant in patients with deep vein thrombosis.
Blood Coagul. Fibrinolysis **2**, 435-439.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 4350-4354.

- Tran TH, Lammle B, Zbinden B, Duckert F (1986)
Heparin cofactor II: purification and antibody production.
Thromb. Haemost. **55**, 19-23.
- Tumova S, Woods A, Couchman JR (2000)
Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions.
Int. J. Biochem. Cell Biol. **32**, 269-288.
- Urlaub G, Chasin LA (1980)
Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolat reductase activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 4216-4220.
- Van Boeckel CAA, Grootenhuis PDJ, Visser (1994)
A mechanism for heparin-induced potentiation of antithrombin III.
Nature Structural Biology **1**, 423-425.
- Van Dalen JP, Knapp W, Ploem JS (1973)
Microfluorometry on antigen-antibody interaction in immunofluorescence using antigens covalently bound to agarose beads.
J. Immunol. Meth. **2**, 383-392.
- Van Deerlin VMD, Tollefsen DM (1991)
The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans.
J. Biol. Chem. **266**, 20223-20231.
- Van Patten SM, Hanson E, Bernasconi R, Zhang K, Manavalan P, Cole ES, McPherson JM, Edmunds T (1999)
Oxidation of methionin residues in antithrombin. Effects on biological activity and heparin binding.
J. Biol. Chem. **274**, 10268-10276
- Varki A (1993)
Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.
Glycobiology **3**, 97-130.
- Villa P, Aznar J, Vaya A, Espana F, Ferrando F, Mira Y, Estelles A (1999)
Hereditary homozygous heparin cofactor II deficiency and the risk of developing venous thrombosis.
Thrombosis and Haemostasis **82**, 1011-1014.
- Vlodavsky I, Lui GM, Gospodarowicz D (1980)
Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix versus plastic.
Cell **19**, 607-616.
- Weiss P, Ashwell G (1989)
The asialoglycoprotein receptor: properties and modulation by ligand.
Prog. Clin. Biol. Res. **300**, 169-184.
- Wells MJ, Sheffield WP, Blajchman MA (1999)
The clearance of thrombin-antithrombin and related serpin-enzyme complexes from the circulation: role of various hepatocyte receptors.
Thromb. Haemost. **81**, 325-337.
- Wheatley SP, Wang YI (1998)
Indirect immunofluorescence microscopy in cultured cells.
Methods in Cell Biology **57**, 313-331
- Whelan J (1996)
Selectin synthesis and inflammation.
TIBS **21**, 65-69

- Whinna HC, Blinder MA, Szewczyk M, Tollefsen DM, Church FC (1991)
Role of lysine 173 in heparin binding to heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **265**, 8129-8135.
- Whinna HC, Choi HU, Rosenberg LC, Church FC (1993)
Interaction of heparin cofactor II with biglycan and decorin.
J. Biol. Chem. **268**, 3920-3924.
- Whinna HC, Church FC (1994)
Characterization of a synthetic peptide from the glycosaminoglycan binding site of heparin cofactor II.
Letters in Peptide Science **1**, 3-8.
- Whisstock J, Lesk AM, Carrell R (1996)
Modeling of serpin-protease complexes: antithrombin-thrombin, alpha 1-antitrypsin (358Met-->Arg)-thrombin, alpha 1-antitrypsin (358Met-->Arg)-trypsin, and antitrypsin-elastase.
Proteins **26**, 288-303.
- Whisstock J, Skinner R, Lesk AM (1998)
An atlas of serpin conformations.
Trends Biochem. Sci. U.S.A. **23**, 63-67.
- White GC, Beebe A, Nielsen B (1997)
Recombinant factor IX.
Thromb. Haemost. **78**, 261-265
- Wilkins PP, Moores KL, McEver RP, Cummings RD (1995)
Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin.
J. Biol. Chem. **270**, 22677-22680.
- Witmer MR, Hatton MW (1991)
Antithrombin III-beta associates more readily than antithrombin III-alpha with uninjured and de-endothelialized aortic wall in vitro and in vivo.
Arterioscler. Thromb. **11**, 530-539
- Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF (1998)
Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice.
Nat. Genet. **20**, 78-82.
- Zammit A, Pepper DS, Dawes J (1993)
Interaction of immobilised unfractionated and LMW heparins with proteins in whole human plasma.
Thromb. Haemost. **6**, 951-958.
- Zehnder JL, Galli SJ (1999)
Mast-cell heparin demystified.
Nature **400**, 714-715.
- Zettlmeissl G, Conradt HS, Nimtz M, Karges HE (1989)
Characterisation of recombinant human antithrombin III synthesized in chinese hamster ovary cells.
J. Biol. Chem. **264**, 21153-21159.
- Zhang GS, Mehringer JH, Deerlin VMD van, Kozak CA, Tollefsen DM (1994)
Murine heparin cofactor II: purification, cDNA sequence, expression, and gene structure.
Biochemistry **33**, 3632-3642.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christoph Böhme
Anschrift: Bahnhofstr. 21 a, 33803 Steinhagen
Geboren: 6.5.1965 in Bielefeld
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbesuch

1971-75 Grundschole Werther
1975-81 Evangelisches Gymnasium Werther (Sekundarstufe I)
1981-85 Max-Planck-Gymnasium in Bielefeld, Abschluß: Abitur

Wehrdienst 1985-1986

Hochschulausbildung

1987-1993 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld
1991-1993 Diplomarbeit an der Universität Bielefeld, Technische Fakultät, AG Zellkulturtechnik (Prof. Dr. Ing. J. Lehmann)
Thema: Untersuchungen zum Filtrationsverhalten von Perfu-
sionsmembranen im Bioreaktor.

Berufliche Tätigkeiten

1993 - 1995 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Bielefeld, Technische Fakultät, AG Zellkulturtechnik (Prof. Dr. Ing. J. Lehmann), Industriekooperationsprojekte

Promotion

1995-2001 Promotion an der Universität Bielefeld, Technische Fakultät, AG Zelluläre Genetik (Prof. Dr. H. Ragg)

